

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Ciências
ULisboa

**A face química da interação patogénico-hospedeiro:
Mecanismo da resposta ao stress oxidativo**

Bruno Alexandre dos Anjos Salgueiro

Mestrado Bioquímica
Especialização Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Professor Miguel Sepúlveda Teixeira, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, UNL
Professor Francisco Pinto, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos

não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUÍMICA E BIOLÓGICA



A face química da interação patogénico-hospedeiro: Mecanismo da resposta ao stress oxidativo

Bruno Alexandre dos Anjos Salgueiro

Mestrado Bioquímica
Especialização Bioquímica Médica

O trabalho exposto nesta dissertação de mestrado foi executado no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, na unidade de Metaloproteínas e Bioenergética sob a orientação direta do Prof. Miguel Sepúlveda Teixeira no âmbito do Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
O desenvolvimento do trabalho teve a colaboração adicional do Dr. Filipe Folgosa e da Mestre Maria Carlos Martins no processo de orientação

Índice

Índice	I
Agradecimentos	IV
Objetivos	V
Resumo da dissertação	VI
Abstract	VII
Abreviaturas	VIII
Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XII
1. Introdução	2
1.1. Impacto do oxigénio nos seres vivos	2
1.2. <i>Clostridium difficile</i>	4
1.2.1. Características Gerais	4
1.2.2. Fatores envolvidos nas patologias causadas	4
1.2.3. Mecanismo de atuação do sistema imunitário face à presença de <i>C. difficile</i>	5
1.2.4. Mecanismos de destoxificação de ROS e/ou RNS	6
1.3. Rubredoxina	7
1.3.1. Características estruturais	7
1.3.2. Função Biológica	8
1.4. Rubredoxina de alto peso molecular (do inglês <i>High Molecular Weight Rubredoxin, HMW-Rd</i>)	8
1.4.1. Características gerais	8
1.5. Proteína flavodiférrica	10
1.5.1. Características gerais	100
1.5.2. Proteína Flavodiférrica Classe A	11
1.5.2.1. Características gerais	11
1.5.2.2. Função biológica	11
2. Materiais e Métodos	13
2.1 Extração e Purificação de DNA plasmídico	14
2.2 Expressão de proteína	14
2.2.1. Transformação de células competentes com DNA plasmídico	14
2.2.2 Testes de expressão das proteínas	14
2.2.2.1 Teste de expressão para o enzima HMW-Rd	14
2.2.2.2. Testes de expressão para o enzima FDP e a proteína Rd	15
2.3. Expressão das proteínas de interesse em larga escala	15
2.3.1. Sobre-expressão do enzima FDP	15

2.3.2. Sobre-expressão do enzima HMW-Rd.....	15
2.3.3. Sobre-expressão da proteína Rd	16
2.4. Purificação das Proteínas.....	16
2.4.1- Primeiro passo da Purificação das Proteínas	16
2.4.2 Purificação do enzima FDP.....	16
2.4.3 Purificação do enzima rubredoxina com alto peso molecular.....	17
2.4.4. Purificação da proteína rubredoxina.....	17
2.5 Caracterização de Proteínas.....	17
2.5.1 Determinação da concentração de proteína /ferro /flavina.....	17
2.5.2 Determinação do estado oligomérico	18
2.5.3 Determinação do tipo de flavina	19
2.6 Cristalografia.....	20
2.6.1 Cristalografia do enzima FDP	20
2.6.2 Cristalografia do enzima HMW-Rd	20
2.6.3 Cristalografia da proteína Rubredoxina	20
2.7 Métodos espectroscópicos	21
2.7.1 Titulações Redox.....	21
2.7.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica	21
2.7.3 Ensaios Cinéticos	21
2.7.3.1 Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd	22
2.7.3.2 Transferência eletrônica da HMW para Rubredoxinas de diferentes organismos	22
2.7.3.3 Transferência eletrônica entre as três proteínas (HMW-Rd; Rd; FDP).....	22
2.7.3.4 Transferência eletrônica na redução do O ₂ e do NO.....	22
2.8 Métodos Amperométricos	23
2.8.1 Consumo de oxigénio.....	23
2.8.1.1 Consumo de oxigénio pelas enzimas.....	23
2.8.2 Consumo de óxido nítrico	24
2.8.2.1 – Consumo de óxido nítrico pelos enzimas	24
2.9- Atividade peroxidase do FDP	25
3. Resultados/Discussão	27
3.1 Testes de expressão e purificação das proteínas.....	28
3.1.1 Testes de expressão da enzima HMW-Rd.....	28
3.1.2 Purificação das proteínas.....	29
3.1.2.1 - Proteína Flavodiférrica (FDP).....	29
3.1.2.2 Rubredoxina com alto peso molecular (HMW-Rd)	30
3.1.2.3 Rubredoxina de Clostridium difficile (Rd).....	32
3.2 – Caracterização das proteínas	34
3.2.1 -Quantificações.....	34

3.2.2 – Determinação do estado oligomérico	35
3.2.2.1 – Determinação do estado oligomérico do FDP	35
3.2.2.2 – Determinação do estado oligomérico do enzima HMW-Rd	35
3.2.3 – Determinação do tipo de Flavina.....	36
3.2.4 – Cristalografia.....	36
3.2.4.1 – Cristalografia da proteína Flavodiférrica.....	36
3.2.5 – Estruturas obtidas por homologia.....	37
3.2.5.1 – Estrutura da FDP obtida por homologia.....	37
3.2.5.2 – Estrutura da rubredoxina obtida por homologia.	38
3.3 – Ensaios espectroscópicos	39
3.3.1 – Titulações Redox.....	39
3.3.1.1 – Titulação Redox do enzima FDP.....	39
3.3.1.2 – Titulação Redox do enzima HMW-Rd.....	41
3.3.1.3 – Titulação Redox da proteína Rd.....	41
3.3.2 – Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica	42
3.3.2.1 – Espectro de RPE do enzima FDP.....	42
3.3.2.2 – Espectro de RPE do enzima HMW-Rd e da Rd	43
3.4 – Ensaios Cinéticos	44
3.4.1 – Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd	44
3.4.2 – Transferência eletrônica entre as proteínas	47
3.4.2.1 –Transferência eletrônica do HMW-Rd para Rd de diferentes organismos.....	47
3.4.2.2 – Transferência eletrônica entre HMW-Rd e FDP	49
3.4.2.3 – Transferência eletrônica entre as três proteínas (HMW-Rd, Rd e FDP)	50
3.4.2.4 Oxidação das proteínas com o NO e Oxigênio	51
3.5 - Ensaios Amperométricos	53
3.5.1 – Seletividade para o oxigênio	55
3.5.1.1 – Atividade do enzima HMW-Rd para substrato O ₂	55
3.5.1.2 – Atividade dos enzimas com diferentes combinações entre elas para o substrato Oxigênio.....	55
3.5.1.3 – Atividade redutase do oxigênio do enzima FDP	57
3.5.2 – Seletividade para o NO.....	58
3.5.2.1 – Atividade redutase do NO do enzima FDP	58
3.6 - Atividade peroxidase do enzima FDP.....	59
3.7 Discussão geral.....	61
4 . Conclusão	64
Referências bibliográficas	66
Anexos.....	70

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação só foi possível devido aos vários apoios e incentivos que fui recebendo ao longo da sua realização, aos quais estarei eternamente grato.

Ao meu orientador, Professor Miguel Sepúlveda Teixeira, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este projeto de mestrado, contribuindo em muito na minha formação académica e científica. Agradeço ainda pela orientação, disponibilidade, transmissão de conhecimentos e pelas críticas ao longo da realização deste trabalho.

Ao PhD Filipe Folgosa e à Mestre Maria Martins gostaria de expressar o meu profundo agradecimento pelo companheirismo, força e apoio incondicional em todo o meu percurso pelo ITQB. Gostaria também de agradecer pelas críticas e pelos “raspanetes” que contribuíram em muito para a realização desta tese da melhor forma possível e que permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação, sendo que sem a ajuda destas duas pessoas em particular não teria conseguido realizar todo o trabalho

Gostaria também de agradecer à Dra. Célia Romão e à aluna de Doutoramento Patrícia Borges pela paciência e apoio na fase de cristalização das proteínas.

A todos os membros da Unidade de Metaloproteínas e Bioenergética, nomeadamente à Filipa Calisto, Paulo Castro, Andreia Silva, Sónia Pereira e aos restantes membros da Unidade pelo apoio e paciência que me cederam ao longo deste ano letivo. Pelos almoços com temas sempre muito particulares e pelos convívios ao longo do meu percurso pelo ITQB.

Gostaria também de agradecer aos meus Colegas e Amigos, nomeadamente à Tânia Martins, Rita Guedes, Joana Catarro, Lara Igrejas, entre outros pela companhia nas longas tardes de estudo, partilha de conhecimentos e pela amizade

Por ultimo, mas as pessoas que mais importância têm para a realização desta etapa, sendo que sem elas nada disto teria sido possível, deixo um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã, pela coragem, apoio incondicional, incentivo, paciência e total ajuda na superação dos obstáculos, que demonstraram ao longo desta caminhada.

A todos o meu profundo e sincero, MUITO OBRIGADO!

Este trabalho foi financiado pela fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), projeto PTDC/BBB-BQB/3135/204 e LISBOA-01-0145-FEDER-007660 (ITQB MOSTMICRO unit)

Objetivos

A elaboração deste trabalho teve como objetivo principal, elucidar possíveis vias para a destoxificação do organismo *C. difficile* no processo de alojamento e infecção no colon intestinal dos hospedeiros.

A incidência e a severidade da infecção por *Clostridium difficile* têm vindo a aumentar ao longo dos últimos anos, em meio hospital por todo o mundo, constituindo um grave problema de saúde pública acarretando um acréscimo do período de hospitalização bem como o aumento dos custos para os sistemas nacionais de saúde.

Desse modo, recorreu-se ao genoma da estripe P28 do patogénico em estudo, de modo a se encontrar enzimas que participam no stress oxidativo e nitrosativo. Tendo-se encontrado uma proteína flavodiférrica da classe A (FDP), que pertence a uma família de proteínas que participam na metabolização de substratos, como oxigénio e óxido nítrico, bem como outras proteínas como NAD(P)H: rubredoxina oxidoreductase (HMW-Rd) e rubredoxina podendo funcionar como possíveis parceiros de redução da FDP.

As proteínas descritas anteriormente foram clonadas em *E.coli* BL21(DE3)GOLD, tendo sido realizado a caracterização bioquímica e a possível interação entre as diferentes proteínas como intuito da redução do FDP para uma possível metabolização dos substratos.

Resumo da dissertação

As proteínas flavodiféricas (FDP's) são uma família de enzimas que estão associadas a processos de destoxificação de oxigénio e/ou espécies reativas de azoto (RNS), por esse motivo pretendeu-se com este trabalho compreender o papel de uma proteína flavodiférica de classe A presente no genoma do organismo *Clostridium difficile* P28 no metabolismo destas espécies.

Este estudo torna-se importante pelo fato que no processo de infeção, o *Clostridium difficile* se depara com vários stresses entre os quais oxidativo (oxigénio no meio do hospedeiro) e nitrosativo, proveniente do sistema imunitário do hospedeiro, e esta enzima pode ser uma das possíveis vias para que o organismo possa sobreviver face a ambientes hostis.

Foi realizada a caracterização bioquímica da proteína de interesse bem como dos seus possíveis parceiros de redução (rubredoxina de alto peso molecular (HMW-Rd) e rubredoxina (Rd)), bem como a avaliação da sua atividade específica no metabolismo de diferentes substratos, nomeadamente oxigénio, óxido nítrico e peróxido de hidrogénio.

Determinou-se que o enzima FDP se encontra no estado tetrâmero apresentando dois ferros e uma flavina por proteína, tendo sido determinado um tamanho por monómero de aproximadamente 44kDa e estimou-se um potencial de redução da flavina de +70 mV e +30 mV apresentando uma semiquinona vermelha.

Após se ter obtido um mecanismo reacional para a redução do FDP avaliou-se a sua atividade específica para os diferentes substratos obtendo-se uma atividade específica para o oxigénio de 0.43s^{-1} , para o óxido nítrico de 0.114s^{-1} e de 0.06s^{-1} para o peróxido de hidrogénio.

Deste modo pode concluir-se que o enzima apresenta atividade para os três substratos testados, podendo apresentar uma contribuição na eliminação do stress oxidativos e nitrosativo.

Palavras-chaves: stress oxidativo, proteína flavodiférica, rubredoxina de alto peso molecular, rubredoxina, *C. difficile*.

Abstract

Flavodiiron proteins (FDPs) are a family of enzymes that are associated with detoxification processes of oxygen and / or reactive nitrogen species (RNS). In this work, the role of a class A flavodiiron protein present in the genome of the pathogenic bacterium *Clostridium difficile* P28 will be studied. This study becomes important because during the infection process, *Clostridium difficile* faces various stresses including oxidative and nitrosative, namely from the host's immune system. Therefore, this enzyme may be one of the possible pathways for the bacteria to survive in hostile environments.

The biochemical characterization of the protein of interest as well as of its possible redox partners (high molecular weight rubredoxin, HMW-Rd, and rubredoxin, Rd), as well as the evaluation of its specific activity in the metabolism of different substrates, namely oxygen, nitric oxide and hydrogen peroxide was performed

It was determined that the FDP enzyme is in the tetrameric state having two irons and one flavin per monomer, a size per monomer of approximately 44kDa having been determined and a potential of reducing the flavin of +70 mV and +30 mV having a red semiquinone was estimated.

After obtaining a reaction mechanism for the reduction of the FDP its specific activity was evaluated for the different substrates obtaining a specific activity for oxygen of 0.43s^{-1} , for the nitric oxide of 0.114s^{-1} and for the hydrogen peroxide 0.06s^{-1} .

In this way, we conclude that the enzyme has activity for the three substrates tested, and may contribute to the elimination of oxidative and nitrosative stress.

Keywords: oxidative stress, flavodiiron protein, high molecular weight rubredoxin, rubredoxin, *C.difficile*.

Abreviaturas

AP-1	Proteína ativadora 1
BCA	Ácido bicinconínico
CAT	Catalase
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
D	Diálise
DCPIP	2,6-Dicloroindofenol
E	Absortividade molar
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FA	Ácido fórmico
FAD	Dinucleotido de flavina e adenina
FDP	Proteína flavodiférrica
FMN	Mononucleótido de flavina
Géis SDS-Page	Géis de poliacrilamida com sódio dodecilo sulfato
Gox	Glucose oxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HO●	Hidroxilo
HMW-Rd	Rubredoxina com alto peso molecular
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL- 22	Interleucina 22
IL - 1β	Interleucina 1β
ILC	Célula linfóide inata
INF- γ	Interferão gama
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KAN	Canamicina

Meio LB	Meio Luria -Bertani
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
O/D	Densidade ótica
O ₂	Oxigénio molecular
O ₂ ^{•-}	Anião superóxido
P	Pellet
PDB	Banco de dados de estrutura de proteínas (do inglês <i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	Do inglês <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
QS	Q-Spharose
Rd	Rubredoxina
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPM	Rotações por minuto
RNS	Espécies reativas de azoto
S	Sobrenadante
S75	Superdex 75
SOD	Dismutase do superóxido
SOR	Redutase do superóxido
TcdA	Toxina A de <i>Clostridium difficile</i>
TcdB	Toxina B de <i>Clostridium difficile</i>
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
UV	Ultra-violeta
Vis	Visível

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Esquema da formação de ROS e RNS e sistemas de destoxificação.....	3
Figura 1.2 - <i>Clostridium difficile</i>	4
Figura 1.3 - Esquema do processo de infecção e consequente resposta imunitária do hospedeiro	5
Figura 1.4 - Estrutura da rubredoxina de <i>Desulforibrio vulgaris</i> - <i>Miyazaki f.</i>	7
Figura 1.5 - Espetro de absorção UV-Visível característico de rubredoxinas	8
Figura 1.6 - Possível mecanismo da transferência eletrônica dos dois domínios do enzima HMW-Rd.....	9
Figura 1.7 - Espetro de absorção UV-Vis de HMW-Rd.....	9
Figura 1.8 - Estrutura do homodímero da FDP classe B “The crystallographic structure flavorubredoxin from <i>Escherichia coli</i> ”	10
Figura 1.9 - Classes estruturais das proteínas flavodiférricas, baseadas na extensão do C-terminal	10
Figura 1.10 - Espetro de absorção UV-VIS característico de FDPs classe A	11
Figura 1.11 - Modelo de transferência eletrônica para o metabolismo de O ₂ e NO em espécies não tóxicas.....	12
Figura 2.12 - Esquema para a quantificação do ferro e da flavina.....	18
Figura 2.13 - A) cromatograma típico dos padrões utilizado na determinação do estado oligomérico dos enzimas monitorizado a 280 nm. B) Relação entre o Log da massa molecular dos compostos e volume eluído na coluna.....	19
Figura 2.14 - Ilustração da metodologia utilizada nos ensaios realizados para a determinação da redução de oxigênio pelas proteínas.....	24
Figura 2.15 - Ilustração da metodologia utilizada nos ensaios realizados para a determinação da redução do NO pelas proteínas.....	25
Figura 2.16 - Ilustração de um ensaio modelo realizado para a determinação da atividade peroxidase do FDP.....	26
Figura 3.17 - SDS -PAGE 15% das amostras dos testes de expressão de HMW-Rd.....	28
Figura 3.18 - Cromatograma obtido a 280nm na purificação do enzima FDP, representado a separação de diferentes proteínas à saída da coluna Q-Spharose.....	29
Figura 3.19 - Espetros de absorção UV-VIS da fração obtida na coluna Q-Spharose e da fração reconstituída com Fe e flavina	30
Figura 3.20 - A) SDS-PAGE 15% das amostras recolhidas ao longo da purificação do enzima FDP. B) Fração final em tampão 50mM Tris-HCl pH7.5 + 18% glicerol.....	30
Figura 3.21 - Cromatograma obtido a 280nm na purificação do enzima HMW-Rd, representado a separação de diferentes proteínas à saída da coluna Q-Spharose.....	31
Figura 3.22 - Espetros de absorção UV-VIS das 4 frações do HMW-Rd obtidas.....	31
Figura 3.23 - A) SDS -PAGE 15% das amostras recolhidas do enzima HMW-Rd B) Fração final em 50mM Tris-HCl pH7.5 +18% glicerol.....	32
Figura 3.24 - A) Cromatograma obtido a 280nm na purificação da proteína Rd, representado a separação de diferentes proteínas à saída da coluna Q-Spharose B) Cromatograma obtido a 280nm na purificação da proteína Rd, representado as três injeções e separação de diferentes proteínas à saída da coluna Superdex S75.....	33
Figura 3.25 - Espetro de Absorção UV-VIS da rubredoxina de <i>C.difficile</i>	33
Figura 3.26 - A) SDS -PAGE a 15% das amostras recolhidas da proteína Rd B) Fração final em tampão 50mM Tris-HCl pH7.5 +10% glicerol.....	34
Figura 3.27 - A) Cromatograma obtido a uma absorvância de 280 nm da eluição da FDP e da mistura de padrões na coluna analítica Superdex200 10/300GL. B) Reta de calibração contendo	

o Log das massas moleculares dos padrões conhecidos e da massa molecular da amostra.....	35
Figura 3.28 - A) Cromatograma obtido a uma absorvância de 280 nm da eluição do HMW-Rd e do padrão na coluna analítica Superdex200 10/300GL. B) Reta de calibração contendo o Log das massas moleculares dos padrões conhecidas e da massa molecular da amostra.....	35
Figura 3.29 - Cromatogramas utilizados para a determinação do tipo de flavina presente no HMW-Rd e na FDP, usando FAD e FMN como padrões.....	36
Figura 3.30 - Cristais do enzima FDP.....	36
Figura 3.31 - Cristais do enzima FDP. A) Cristais em forma de agulhas B) Cristais em forma de bastonetes C) cristais em forma de placas	37
Figura 3.32 - Estrutura do homodimero da FDP de <i>Clostridium difficile</i> construído por homologia através do programa PHYRE2 utilizando como proteína modelo com a estrutura do homodimero da FDP classe A de <i>Moorella thermoacetica</i>	38
Figura 3.33 - Estrutura da rubredoxina de <i>Clostridium difficile</i> obtida por homologia com a rubredoxina de <i>Desulforibrio vulgaris</i> - Miyazaki f.....	38
Figura 3.34 - Estados redox do cofator flavina ^[44]	39
Figura 3.35 - A) Espectros de absorção de UV-VIS da titulação redox do enzima FDP de <i>Clostridium difficile</i> com 5 mM ditionito de sódio. B) Variação da absorvância a 450 nm C) Variação da absorvância a 360 nm.....	40
Figura 3.36 – A) Redução gradual do enzima FDP com ditionito de sódio 5mM. B) Curvas das diferentes populações oxidadas ao longo do potencial obtidas pelas equação de Nernst.....	40
Figura 3.37 - A) Espectros de absorção de UV-VIS da titulação redox do enzima HMW-Rd de <i>Clostridium difficile</i> com 5mM ditionito de sódio. B) Variação da absorvância e 450 nm C) Variação da absorvância a 475nm.....	41
Figura 3.38 - Espectros de UV-VIS da titulação do HMW-Rd com quantidades equivalentes de NADH	41
Figura 3.39 - Titulação redox da proteína rubredoxina de <i>Clostridium difficile</i> com 5mM ditionito de sódio. B) Variação da absorvância a 490 nm ao longo do potencial a partir da equação de Nernst.....	42
Figura 3.40 - Espectro de RPE do enzima FDP como isolado e no estado de valência mista reduzida com menadiol.....	43
Figura 3.41 - Espectro de RPE do enzima HMW-Rd oxidado.....	43
Figura 3.42 - Espectro de EPR da proteína rubredoxina oxidada.....	44
Figura 3.43 -Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd determinada com concentrações crescentes de NADH ou NADPH como doadores de elétrons e DCPIP como aceitador de elétrons seguido a comprimento de onda de 620 nm.....	45
Figura 3.44 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd determinada com concentrações crescentes de DCPIP tendo como NADH ou NADPH seguido a comprimento de onda de 340 nm.....	45
Figura 3.45 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd determinada com concentrações crescentes de Rubredoxina tendo como NADH ou NADPH seguido a comprimento de onda de 340 nm.....	46
Figura 3.46 - Alinhamento da sequencia de aminoácidos baseado na sobreposição das estruturas das rubredoxinas.	48
Figura 3.47 - Ensaio cinético da transferência eletrônica entre o enzima HMW-Rd e rubredoxina de diferentes organismos.....	49

Figura 3.48 - Redução de 20 μ M de FDP, usando como sistema de transferência eletrônica 20 μ M de HMW-Rd com 1mM de NADH, seguido a um comprimento de onda de 460 nm.....	50
Figura 3.49 - Redução de 20 μ M de FDP, pelo sistema de transferência eletrônica de 20 μ M de HMW-Rd, 20 μ M Rd, 5mM NADH em condições anaeróbicas.....	51
Figura 3.50 - Redução de 20 μ M de FDP, utilizando 5 μ M HMW-Rd, 20 μ M Rd, 1mM NADH em condições anaeróbicas seguido de oxidação com 10 μ M de Oxigênio ou com NO.....	52
Figura 3.51 - Mecanismo de transferência eletrônica entre o HMW-Rd, Rd e FDP.....	52
Figura 3.52 - Alinhamento da sequencia de aminoácidos baseado na sobreposição das estruturas das FDPs.....	54
Figura 3.53 - Atividade do HMW-Rd para o oxigênio na ausência inicial de catalase.....	55
Figura 3.54 - Monitorização da atividade especifica das diferentes proteínas para o oxigênio com diferentes sistemas de transferência eletrônica.....	56
Figura 3.55 - Atividade especifica do FDP para o oxigênio com diferentes concentrações de HMW-Rd.....	57
Figura 3.56 - Atividade especifica do FDP para o oxigênio com diferentes concentrações de Rd..	58
Figura 3.57 - Atividade do enzima FDP para a redução do NO.....	59
Figura 3.58 - Monitorização do consumo de NADH exercido após a injeção de peróxido de hidrogênio na presença (linha azul) e na ausência (linha magenta) do enzima FDP.....	60
Figura 3.59 - Atividade especifica do FDP na redução do substrato peróxido de hidrogênio.....	61

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Lista de padrões utilizados na determinação do estado oligomérico das proteínas com a referida massa molecular e concentração utilizada.....	19
Tabela 3.2 - Quantificação das proteínas em relação a concentração de proteína, ferro e flavina...	34
Tabela 3.3 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd, determinação de Vmax e K _M tendo concentrações crescentes de NAD(P)H como dador de elétrons e DCPIP como aceitador de elétrons.....	45
Tabela 3.4 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd, determinação de Vmax e K _M NAD(P)H como dador de elétrons e concentrações crescentes de DCPIP como aceitador de elétrons.....	46
Tabela 3.5 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd, determinação de Vmax e K _M NAD(P)H como dador de elétrons e concentrações crescentes de Rd como aceitador de elétrons...	46
Tabela 3.6 - Comparação dos potenciais de redução de rubredoxinas de diferentes organismos...	48
Tabela 3.7 - Atividade especifica das diferentes proteínas, consoante o sistema de transferência eletrônica.....	56
Tabela 3.8 - Atividade especifica do FDP com diferentes concentrações de HMW-Rd (0-20 μ M)...	57
Tabela 3.9 - Atividade especifica do FDP com diferentes concentrações de Rd (0-200 μ M).....	58
Tabela 3.10 - Atividade especifica do FDP para a redução do substrato NO.....	59
Tabela A 1. - lista de proteínas que possivelmente estão associadas à destoxificação de ROS e RNS do genoma completo de <i>Peptoclostridium difficile</i> P28.....	70

Parte I

Introdução

1. Introdução

1.1. Impacto do oxigénio nos seres vivos

O oxigénio na sua forma molecular, O_2 , é considerado como o motor primário para a evolução biológica. Segundo muitos autores, o aumento da concentração de oxigénio deveu-se ao aparecimento de processos fotossintéticos produtores de O_2 nas cianobactérias há cerca de 2,2 – 2,5 biliões de anos, pelos quais o seu nível subiu exponencialmente, estabilizando por volta dos 21% da composição total da atmosfera terrestre. Este episódio global ficou conhecido como o grande evento de oxidação (do inglês, *Great Oxygen Event*, GOE) ^[1,2,3].

O oxigénio apresenta alguns aspetos negativos nos sistemas biológicos, sendo em concentrações elevadas tóxico para as células. Devido ao seu grande poder de oxidação apresenta uma grande facilidade de receber eletrões em reações de oxidação-redução ^[3,4]. Tem, contudo, uma reatividade limitada pois no seu estado fundamental é um tripleto, cujas orbitais apresentam 2 eletrões desemparelhados com o mesmo spin. O O_2 pode reagir com radicais de componentes orgânicos, nomeadamente flavinas, ou com centros de metais de transição, principalmente de ferro ^[3,6]. Após essas reações de transferência eletrónica podem ser geradas espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*, ROS) ^[2,3,4,5,6]. Estes subprodutos formados possuem alta reatividade com múltiplos componentes celulares, podendo levar à sua destruição e/ou inibição ^[4].

A partir do aumento da concentração de oxigénio, os organismos tiveram de encontrar mecanismos de forma a se adaptar a estas novas condições atmosféricas ^[3,4]. Alguns organismos, para evitarem as altas concentrações de O_2 , estabeleceram-se em nichos anaeróbicos, evoluindo e mantendo o seu meio intracelular reduzido ^[3]. Por outro lado, apareceram organismos que conseguiram utilizar o O_2 em processos biológicos, extraindo dos substratos celulares uma maior quantidade de energia, assim permitindo o aparecimento de formas de vida mais complexas ^[3,4].

As ROS, em concentrações baixas, podem também servir como importantes moléculas de sinalização e estimulando a defesa imunitária do hospedeiro contra patogénicos ^[3,7].

O óxido nítrico, NO, é uma outra molécula que apresenta um papel fundamental no metabolismo dos seres vivos, assegurando, em baixas concentrações, a sinalização de inúmeros processos em eucariotas, e em maiores concentrações servindo de defesa imunitária. Em altas concentrações e em condições aeróbicas reage rapidamente com o oxigénio e/ou com ROS formando espécies ainda mais reativas designadas por espécies reativas de azoto (do inglês *reactive nitrogen species*, RNS) ^[3,6].

A redução tanto do O_2 como do NO é um processo importante nos procariotas. No caso do O_2 a sua redução por processos sucessivos de um eletrão produz ROS, sendo os mais destacados os radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (HO^{\bullet}), e o agente oxidante não-radicalar peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ^[2,3,4,6] - Figura 1- A.

Os organismos protegem-se das espécies reativas de oxigénio através de enzimas como a dismutase ou a reductase do superóxido (SOD, SOR), catalase (CAT) e substâncias antioxidantes, entre outros que são capazes de converter essas ROS em moléculas não tóxicas para as células ^[2,3,4,6] - Figura 1.

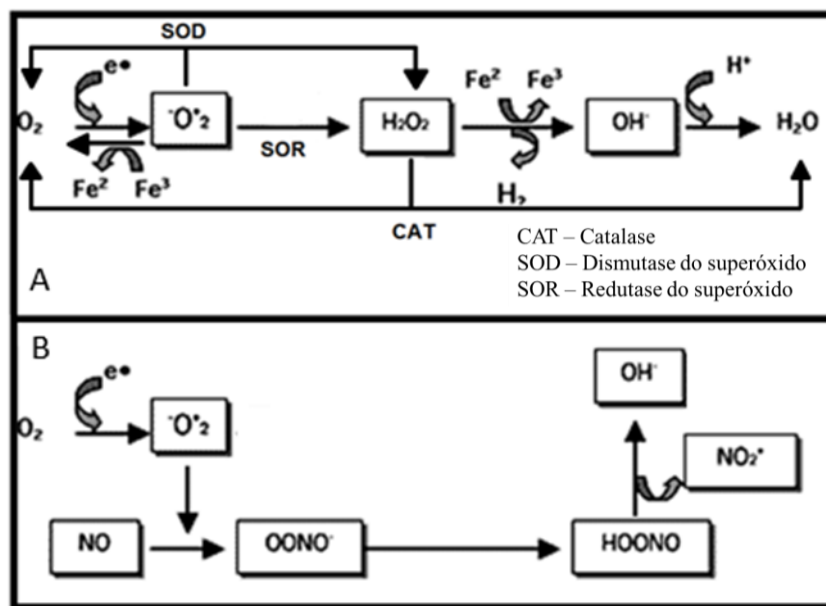
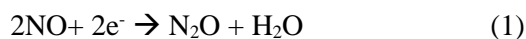


Figura 1 - Esquema da formação de (A) ROS e (B) RNS e sistemas de detoxificação

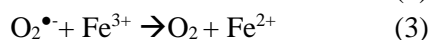
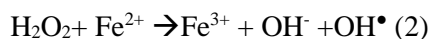
No que diz respeito ao NO, a desnitrificação bacteriana incompleta produz óxido nitroso (N_2O) que é diretamente libertado pela célula e convertido em N_2 . A redução do NO é efetuada por NO redutases, que através do consumo de 2 eletrões convertem duas moléculas de NO em N_2O e H_2O (1) [8].



Em geral tanto os ROS como os RNS têm um tempo de vida bastante curto (10^{-9} a 10^{-6} s) reagindo rapidamente com moléculas próximas [9], [3,10]. De acordo com um estudo desenvolvido por Bruice e colaboradores (1984) foi demonstrado que numa fase inicial a oxidação da hidroquinona da flavina provocada pelo O_2 promove a formação de radicais de flavina, semiquinona, e $O_2^{\bullet-}$, pela transferência de um único eletrão [10,11].

Em relação aos metais dentro da célula, nomeadamente o ferro, estes apresentam um papel importante nas atividades redox da mesma, porém são limitados fisiologicamente, devido à sua toxicidade. A presença destes metais está fortemente associada à formação de radicais livres [6,12].

Vários estudos mostraram que existem mecanismos que regulam a concentração de ferro nas células, assegurando que não exista ferro livre intracelularmente, porém *in vivo* sob condições de excesso de $O_2^{\bullet-}$, este atua como oxidante de enzimas contendo centros [FeS], libertando-se ferro livre no interior da célula [12]. O Fe^{2+} libertado na célula pode participar na reação de Fenton (2), gerando o radical hidroxilo altamente reativo (HO^{\bullet}), que após a redução com um único eletrão é convertido em H_2O . Combinando a reação de Fenton e a redução de Fe^{3+} pelo $O_2^{\bullet-}$, resulta na formação de $HO^{\bullet} + O_2$ (3) [6,12], [2,3,4,6].



1.2. *Clostridium difficile*

1.2.1. Características Gerais

Clostridium difficile (*C. difficile*) é uma bactéria gram-positiva – Figura 2-, anaeróbica estrita e esporogénica ^[13,14,15]. Este patogénico apresenta-se como um grande problema no que diz respeito à saúde pública, devido à sua forma de propagação e os seus sintomas levam em média anualmente nos E.U.A à morte de 29.000 pacientes ^[14].

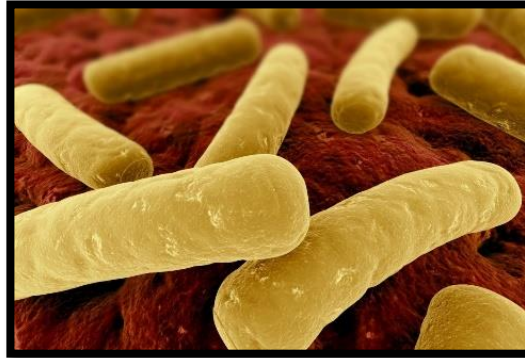


Figura 2 - *Clostridium difficile* ^[7]

Os sintomas causados no hospedeiro após infeção são diarreia, podendo ir de leve a grave, havendo a possibilidade em casos mais extremos de desencadear colite pseudomembranosa, potencialmente fatal ^[13,14,15]. O mecanismo de infeção, de uma maneira geral, consiste na produção de esporos que após a entrada no organismo se alojam no colon, germinando e libertando toxinas que causam os sintomas da infeção ^[13].

Existem algumas vulnerabilidades que fazem com que alguns pacientes sejam mais sensíveis à contração desta bactéria que outros, sendo que a maior causa é o uso abusivo de antibióticos que destabilizam a flora intestinal alterando substancialmente o ambiente envolvente contribuindo para o crescimento favorável do organismo; outra das causas é a faixa etária dos indivíduos, sendo que pessoas acima dos 40 anos apresentam um risco mais elevado de contraírem este organismo do que indivíduos de faixas etárias inferiores ^[14].

Os seus esporos, bastante resistentes (podem resistir ao calor, oxigénio e a desinfetantes comuns), são capazes de sobreviver em ambientes aeróbicos o que aumenta a taxa de transmissão dentro do organismo e pela comunidade ^[13,14]. A germinação dos esporos e o crescimento da sua forma vegetativa ocorre somente nas partes mais profundas do trato gastrointestinal, devido às concentrações de O₂ nestes locais serem praticamente nulas. Nestes locais encontram-se substratos que potenciam a germinação de esporos e ativam a replicação de células vegetativas, nomeadamente os ácidos biliares, sendo estes processos controlados pelo gene *CSpBAC* ^[14,16].

1.2.2. Fatores envolvidos nas patologias causadas

C. difficile é capaz de causar problemas ao hospedeiro, devido aos seus fatores de virulência, sendo que os principais fatores são duas toxinas pertencentes à família das citotoxinas clostridiais, toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB) ^[13,14,15]. Estas duas toxinas são responsáveis pela secreção maciça de

fluidos, necrose do tecido colónico e inflamação. Para além destes fatores de virulência, existem ainda mais dois fatores que auxiliam na infeção, que são fatores de aderência e de motilidade [14,15]. Tanto a toxina A como a B são toxinas de estrutura AB homólogas sendo que cada uma pode ser dividida em duas componentes. Uma subunidade A enzimática e uma subunidade B que está envolvida na distribuição da subunidade A no citosol da célula hospedeira. Estas toxinas provocam a disrupção do citoesqueleto e conduzem à desassociação dos espaços entre as células epiteliais e consequente perda da integridade [14].

Ainda não é consensual se o stress oxidativo no ambiente do colon é benéfico para os microrganismos patogénicos em competição com os microrganismos comensais [14]. De facto, em resposta à falta de nutrientes no lúmen do intestino, *C. difficile* produz toxinas que induzem ROS contribuindo como biocidas reduzindo competidores, facilitado a colonização de *C. difficile* no intestino [13,14]. Porém os ROS são mediadores importantes para a comunicação com o sistema imune inato e também são produzidos por outros microrganismos [3,14].

1.2.3. Mecanismo de atuação do sistema imunitário face à presença de *C. difficile*

O mecanismo de atuação das toxinas com consequente infeção de *C. difficile* e a libertação de ROS e RNS está ilustrado na Figura 3 [14].

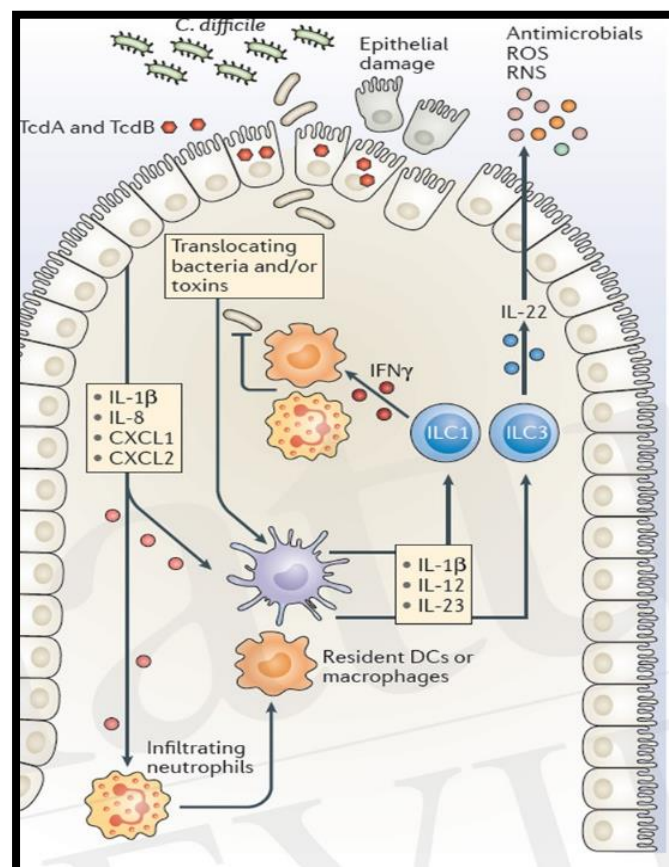


Figura 3 - Esquema do processo de infeção e consequente resposta imunitária do hospedeiro [14]

O sistema imunitário responde rapidamente a moléculas microbianas que atravessam a barreira epitelial.

Assim sendo o processo de inflamação é provocado por TcdA e TcdB de *C. difficile* que ativam o fator nuclear κ B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1) que sinalizam as vias nas células epiteliais do intestino provocando a fosforilação das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), conduzindo à transcrição de quimiocinas pro-inflamatórias como a interleucina 8 (IL-8) e recetores para as quimiocinas inflamatórias como a CXCL1 e CXCL2, que recrutam células do sistema imune inato [14,15]. Ao mesmo tempo ocorre a glucosilação do TcdB e a resultante inativação da RHO GTPase. Nas células epiteliais as toxinas são detetadas pelo recetor pirina intracelular, conduzindo à formação de inflamossomas e à secreção de IL-1 β [14,15].

As células linfoides inatas intestinais (ILC) respondem a IL-1 β , IL-12 e IL-23, produzindo citocinas como a IL-22 e interferão gama (INF- γ). A produção destas citocinas efectoras das ILC's conduzem ao recrutamento de neutrófilos e macrofílos e induzem a expressão de péptidos antimicrobianos, a produção de ROS e RNS e a ativação de mecanismos de reparação das células epiteliais [14].

1.2.4. Mecanismos de destoxificação de ROS e/ou RNS

De modo a se perceber o processo de oposição às dificuldades impostas pelo sistema imunitário na fase de infeção do *C. difficile* no hospedeiro, foram estudados neste trabalho alguns mecanismos de destoxificação de ROS e/ou RNS do patogénico *C. difficile* apresenta no seu genoma um conjunto de enzimas que conseguem converter estas espécies reativas, convertendo-as em moléculas inofensivas para o desenvolvimento do mesmo, servindo como estratégia de defesa contra tensões quer oxidativas quer nitrosativas [5].

D.A. Rasko e colaboradores publicaram em 2013 a sequência genómica completa da estirpe P28 de *C. difficile*, apresentando esta um tamanho de 4.323.423 bp [17].

O genoma de *C. difficile* possui genes – Tabela A1- que codificam proteínas flavodiférricas (FDPs), enzimas capazes de reduzir oxigénio e / ou óxido nítrico, que são difundidas em procariotas. O genoma também contém genes que codificam outras enzimas/proteínas envolvidas na desintoxicação de ROS e RNS, incluindo rubreritrina, rubredoxina, proteína de cluster híbrido, SOD e SOR e outras oxido-redutases [5].

Embora a SOD esteja presente em todos os domínios da vida [2], as FDPs [3], rubreritrina [18] e rubredoxinas [19] têm sido identificadas principalmente em procariotas e anaeróbios. Estas enzimas, apresentam na sua constituição cofatores como flavinas, nomeadamente mononucleótido de flavina (FMN) e centros de ferro [3].

Com este trabalho tentou-se estudar a capacidade de redução tanto do oxigénio como do NO através do uso de três proteínas presentes neste organismo.

Para tal, utilizou-se uma enzima flavodiférrica da classe A, FDP, (WP_008819165.1), uma enzima designada como Rubredoxina com um alto peso molecular, HMW-Rd, (WP_008728528.1) descrita como uma oxidoreductase e uma Rubredoxina, Rb, descrita principalmente como transportador de eletrões (WP_008816574.1).

1.3. Rubredoxina

1.3.1. Características estruturais

As rubredoxinas são as proteínas de ferro-enzofre mais simples, compostas por aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos e com uma massa molecular entre 6-7 kDa, sendo encontradas em inúmeras bactérias e organismos anaeróbios [19,21,22]. Domínios estruturais contendo centros rubredoxina podem também existir em proteínas mais complexas, como por exemplo na reductase de óxido nítrico de *E. coli* (flavorubredoxina) [23], ou nas rubreritrinas [18]. As rubredoxinas têm um centro monomérico de ferro ligado a 4 resíduos de cisteínas provenientes dos dois segmentos Cys-XX-Cys- – Figura 4 - com uma geometria tetraédrica $\text{Fe}(\text{SCys})_4$ [19,21,22,24].

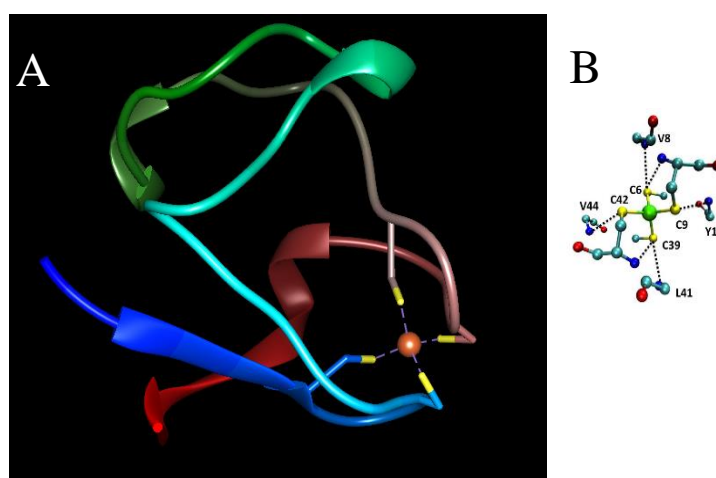


Figura 4 – Estrutura da rubredoxina de *Desulforibrio vulgaris*- Miyszaki f. A) Modelo da estrutura da proteína Rd de *Desulforibrio vulgaris*- Miyszaki f. (PDB: 2rdv). B) Orientação das 4 cisteínas no centro monoférrico [19]

A sua estrutura é em geral composta por 3 cadeias de folhas- β antiparalelas na parte hidrofóbica, e 2 loops contendo as cisteínas ligantes do metal – Figura 4A – sendo esse local de ligação perto da superfície proteica [19].

O potencial de redução típico das Rd varia geralmente na gama de -140 a +125 mV, podendo haver algumas exceções, em que o potencial atinge valores perto dos +250 mV [18,19].

Em relação às suas características espectroscópicas a Rd apresenta um espectro de UV-Visível característico – Figura 5 -, com bandas de absorção com máximos a 350, 380, 490 e 570 nm e um coeficiente de extinção molar a 490nm, $\epsilon_{490} = 7000 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [19,25].

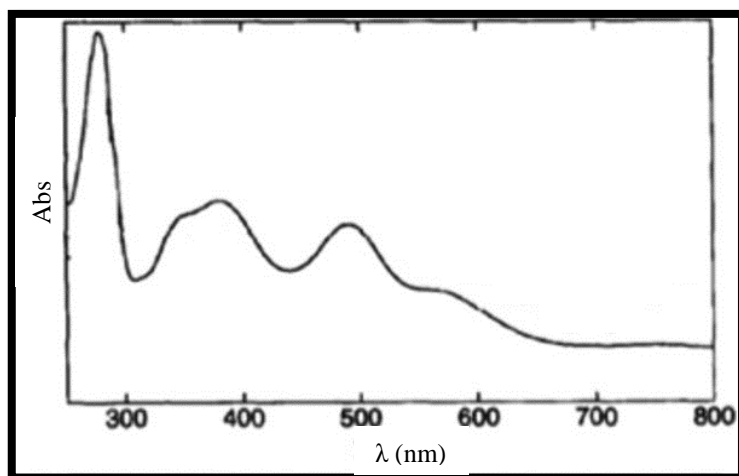


Figure 5 – Espectro de absorção UV-Visível característico de rubredoxinas no estado oxidado, apresentando bandas de absorção com máximos a 350, 380, 490 e 570 nm ^[19]

1.3.2. Função biológica

As rubredoxinas atuam como transportadores de um eletrão, estando presentes em múltiplos tipos de cadeias de transferência eletrônica, como as de degradação de alcenos, de eliminação de espécies reativas de oxigénio ou de eliminação do mesmo, ou no metabolismo do ferro ^[19,21]. Por exemplo, estudos efetuados em *Desulfovibrio gigas* demonstraram que a Rd é uma proteína importante na defesa do stress oxidativo funcionando como parceiro de NADH:rubredoxina oxidoreductase e rubredoxinas: dioxigénio oxido-redutases ^[21].

1.4. Rubredoxina de alto peso molecular (do inglês *High Molecular Weight Rubredoxin*, HMW-Rd)

1.4.1. Características gerais

Uma rubredoxina mais complexa, que também foi descrita como envolvida em sistemas de destoxificação de ROS é a rubredoxina de alto peso molecular, *High Molecular Weight Rubredoxin*, HMW-Rd ^[20,26,27]. Este é um enzima pouco estudado graças à sua dificuldade de purificação, devido a sua baixa estabilidade ^[20].

Esta proteína é dividida em dois domínios apresentando, um domínio N-terminal homólogo com NAD(P)H Flavinas Oxidoreductases contendo FMN, com atividade redutase de Fe³⁺, e o domínio C-terminal característico de um centro rubredoxina, servindo deste modo como transportador de eletrões ^[20].

Estudos efetuados com enzimas deste tipo determinaram 1 ferro por subunidade, sendo consistente com um único domínio rubredoxina ^[20]. Este tipo de proteína apresenta por norma cerca de 229 resíduos de aminoácidos por monómero e uma massa de cerca de 25 kDa ^[20].

De acordo com ensaios efetuados pensa-se que a transferência eletrônica possa ser efetuada pelo seguinte processo – Figura 6: o NADH cede 2 elétrons ao FMN, sendo de seguida os elétrons transferidos para o centro rubredoxina ^[20].

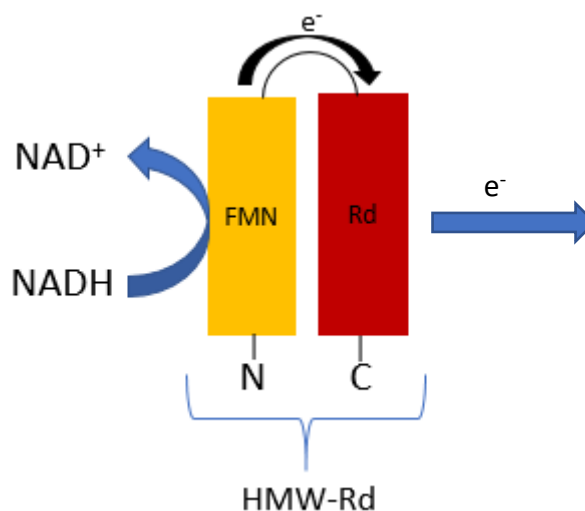


Figure 6- Possível mecanismo da transferência eletrônica dos dois domínios do enzima HMW-Rd

Embora haja pouca informação sobre este tipo de enzima, este apresenta um espectro UV-Vis característico – Figura 7 - no qual se podem observar bandas de absorção com máximos a 450 nm correspondentes à contribuição do FMN e outras bandas de absorção com máximos a 490 e 570 nm correspondentes à contribuição da rubredoxina ^[20].

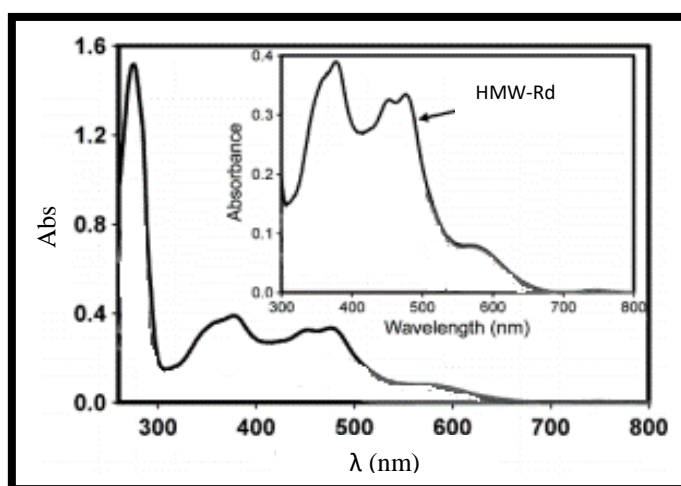


Figure 7 - Espectro de absorção UV-Vis de HMW-Rd no estado oxidado ilustrando bandas de absorção com máximos a 450, 490 e 570nm ^[20]

1.5. Proteína flavodiférrica

1.5.1. Características gerais

Este tipo de proteínas são uma grande família de enzimas que podem ser encontrados em inúmeros procariontes quer anaeróbios como aeróbios, bem como em alguns eucariotas, nomeadamente em protozoários e organismos fotossintéticos [8,28,29,30].

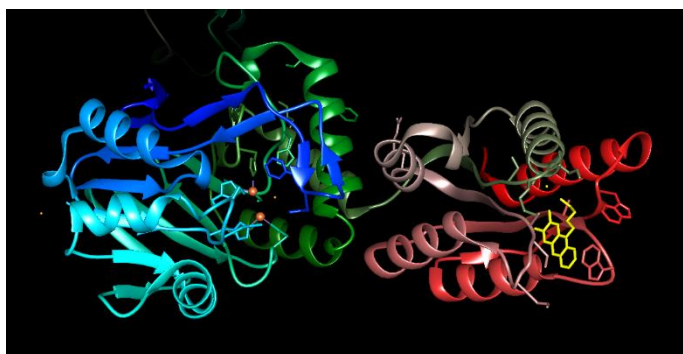


Figura 8- Estrutura do homodímero da FDP classe B “The crystallographic structure flavorubredoxin from *Escherichia coli*” (PDB=4D02) [3]

Estes enzimas são citoplasmáticos e apresentam como unidade mínima funcional o homodímero, sendo observado em vários procariontes anaeróbios na sua forma homodimérica ou homotetramérica sendo que os dímeros estão arranjados em “head to tail”.

De um modo geral, estes enzimas contém em cada monómero dois domínios, um primeiro do tipo metalo- β -lactamase, onde se encontra um centro binuclear de ferro e onde ocorre a redução de O_2 e /ou NO, e um segundo, do tipo flavodoxina, contendo um mononucleótido de Flavina (FMN); no dímero, o FMN de um monómero está localizado a ~ 4 Å do centro de dois ferros do outro domínio – Figura 8. As FDPs de Classe A, que têm apenas estes dois domínios por monómero, apresentam cerca de 400 resíduos de aminoácidos, sendo a classe de FDPs mais encontrada entre os organismos [28,30].

Após uma análise de sequencias de aminoácidos de FDPs, foi possível dividir esta família de proteínas em 4 classes estruturais de acordo com as extensões do C-terminal – Figura 9.

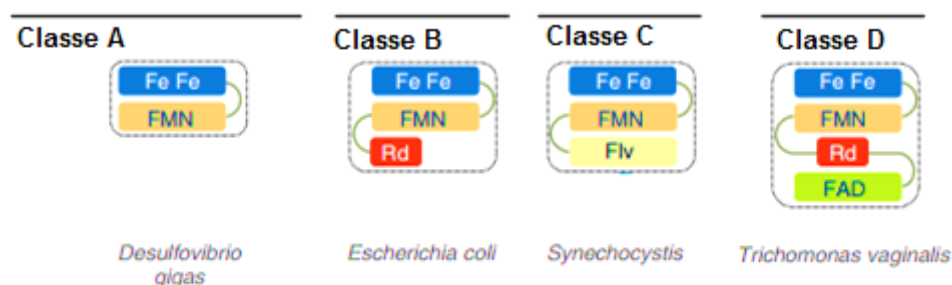


Figura 9 - Classes estruturais das proteínas flavodiférricas, baseadas na extensão do C-terminal estando representado a azul o domínio contendo o centro binuclear de ferro, a laranja o domínio flavodoxina (FMN), a amarelo o domínio FMN, vermelho centro rubredoxina e a verde domínio FAD [28]

As proteínas da classe B, para além dos domínios presentes nas representantes da classe A, possuem também um domínio rubredoxina extra no C-terminal, sendo restritos a proteobactérias. As proteínas desta classe apresentam cerca de 480 resíduos de aminoácidos [28,30].

As FDPs de classe C, têm no C-terminal um domínio NAD(P)H: flavina oxidoreductase. Este tipo de classe é somente encontrada em organismos fotossintéticos produtores de oxigénio, sendo composta por cerca de 600 resíduos de aminoácidos [29,30].

Em relação a classe D, é composta por cerca de 900 resíduos de aminoácidos e apresenta dois domínios no C-terminal, um domínio rubredoxina e um domínio NADH: rubredoxina oxidoreductase [29,30].

1.5.2. Proteína Flavodiférrica Classe A

1.5.2.1. Características gerais.

Em relação às suas características espectroscópicas, o espectro de UV-Visível da forma oxidada apresenta uma banda com um máximo aos 450 nm, correspondente à absorção do cofator FMN, sendo que o coeficiente de extinção do centro de dois ferros é muito mais baixo [29] -Figura 10.

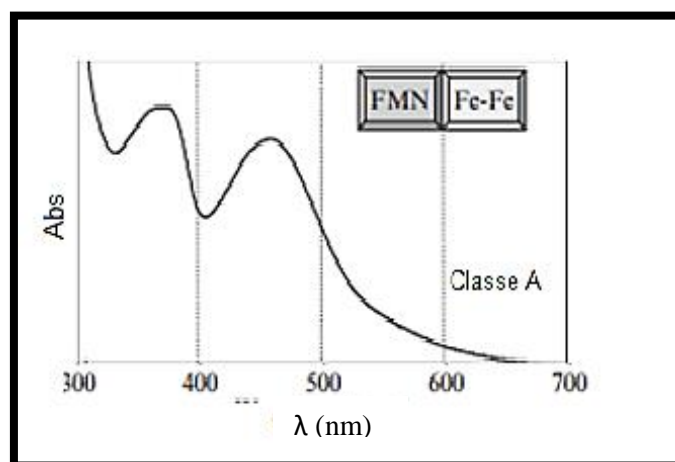


Figura 10- Espectro de absorção UV-VIS característico de FDPs classe A no estado oxidado com a banda de absorção com um máximo a 360 nm e a 450 nm; representação dos domínios estruturais da FDP-classe A [29]

As propriedades termodinâmicas redox destas enzimas, têm sido analisadas através de titulações redox, nas quais se observa a formação de uma semiquinona vermelha após a redução de um eletrão do FMN, caracterizado pela diminuição da absorvância a 450 nm acompanhado pelo aumento a 390 nm, desaparecendo depois, como resultado da redução completa do FMN (hidroquinona) [29].

1.5.2.2. Função biológica

De acordo com estudos efetuados com enzimas desta classe, propôs-se um modelo para a transferência eletrônica na redução tanto do O₂ como do NO – Figura 11. É necessário o uso de proteínas redox mediadoras, que de uma forma geral costumam ser oxidoreductases e rubredoxinas para que a FDP seja capaz de se reduzir e consequentemente converter o O₂ e /ou NO em espécies não tóxicas para a célula [30].

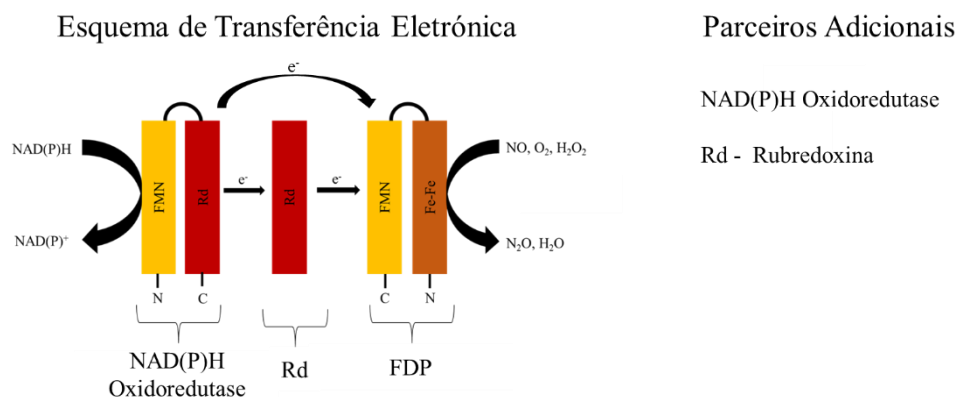


Figura 11- Modelo de transferência eletrônica para o metabolismo de O_2 e NO em espécies não tóxicas
 [adaptada de 20,30]

Esta redução é efetuada à custa do consumo de NAD(P)H como dador de elétrons. Para a redução completa da enzima são necessários 4 elétrons ($\text{FMNH}_2 - \text{FeII FeII}$), podendo deste modo reduzir 4 moléculas de NO a 2 moléculas de N_2O ou uma molécula de O_2 a duas moléculas de H_2O . No fim do processo o sistema é restaurado e a enzima permanece na sua forma oxidada ($\text{FMN}_{\text{ox}} - \text{FeIII FeIII}$) [3].

Estudos demonstraram que muitas FDPs atuam preferencialmente como NO redutases (*E. coli*), O_2 redutase (*Giardia intestinalis*) e ocasionalmente algumas conseguem reduzir ambas as espécies reativas (*Morella thermoacetica*) [31].

Com este trabalho foi proposto estudar o mecanismo de redução tanto do O_2 como do NO utilizando para isso as três proteínas anteriormente descritas, tendo como ponto de partida o modelo de transferência eletrônica mostrado na figura 11.

Parte II

Materiais e Métodos

2. Materiais e métodos

2.1 Extração e Purificação de DNA plasmídico

Os genes codificantes para as proteínas alvo foram clonados no plasmídeo de expressão pET24(+), pela empresa GenScript. Os plasmídeos que continham o gene codificante para as proteínas em estudo foram transformados em células de *E.coli* XL1-Blue. Após a transformação realizada selecionou-se uma colônia (para cada uma das proteínas), que foi ressuspensa em meio Luria-Bertani (LB) líquido suplementado com canamicina 50 ng/mL, ficando a incubar durante a noite a 130 rpm, a 37°C. Após esse passo as células foram centrifugadas 10 min a 6000 rpm, e retirou-se o sobrenadante. O DNA plasmídico foi então purificado com o Kit "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação o DNA contendo o gene de interesse foi então confirmado por eletroforese em gel de agarose e quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop.

2.2 Expressão de proteína

2.2.1. Transformação de células competentes com DNA plasmídico

Nesta etapa foram transformadas células de *E.coli* BL21(DE3)GOLD com diferentes plasmídeos: pET24 (+)_cdFDP, pET24 (+)_cdRd, pET24 (+)_cdHMW_Rd que codificam para as proteínas FDP classe A, Rubredoxina e Rubredoxina com alto peso molecular, respectivamente.

Vetores como pET24 (+) são usados como vetores de transcrição construídos para a expressão a partir de sinais de tradução bacterianos transportados dentro de uma inserção clonada. Na sua sequência apresenta um gene de resistência a canamicina, o que facilita a seleção artificial das colônias bacterianas que contém o plasmídeo de interesse^[32].

Cerca de 50 ng/ml de DNA plasmídico foi adicionado a 40 µL de células competentes e colocou-se em gelo durante 30 min. Passado esse tempo foi dado um choque térmico de 20 segundos a 42°C e as células foram colocadas imediatamente em gelo durante 2 min. Seguidamente foi adicionado 900µL de meio LB líquido e incubou-se durante 60 min a 37°C.

Posteriormente as células foram plaqueadas em meio LB agar suplementado com 50ug/mL de canamicina e incubadas durante a noite numa estufa a 37°C.

2.2.2 Testes de expressão das proteínas

2.2.2.1 Teste de expressão para o enzima HMW-Rd

Como em trabalhos anteriores a expressão e posterior purificação deste enzima não teve sucesso e após se ter realizado uma tentativa de expressão sem êxito, tendo como meio de cultura meio mínimo de M9 com as mesmas condições da expressão da rubredoxina, realizaram-se testes de expressão em meio Luria -Bertani, LB, sendo este um meio mais rico para o crescimento, suplementado com 50ug/mL de canamicina e 1mL de 0.1M FeSO₄. A suplementação de FeSO₄ foi essencial para a incorporação do ferro na proteína, pois com a utilização do meio LB havia a possibilidade de a proteína incorporar outros tipos de metais nomeadamente zinco o que resultaria numa proteína sem atividade. Deste modo, com a predominância do metal Fe no meio de expressão, aumenta-se a probabilidade de a proteína incorporar o mesmo.

As variantes que foram testadas nestes testes de expressão foram a densidade ótica de indução que variou entre 0.8 e 1.8 e a concentração de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) usada na indução (100 μ M, 500 μ M e 1 mM). O nível de expressão através da recolha após a indução (2h, 4h, 6h e durante a noite), foi verificada por géis de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).

As células que foram recolhidas após a incubação durante toda a noite foram centrifugadas a 7000 rpm durante 25 min e, após vários ciclos de congelação (-20°C) e descongelação, avaliou-se a presença ou ausência de proteína solúvel nas várias condições, através de um gel de eletroforese SDS-PAGE.

2.2.2.2. Testes de expressão para o enzima FDP e a proteína Rd

No caso das proteínas FDP e Rd não foi necessário recorrer a testes de expressão devido a já se ter conseguido obter proteína pura em trabalhos anteriores ^[5].

2.3. Expressão das proteínas de interesse em larga escala

A partir das transformações das células de *E.coli* BL21(DE3)GOLD com os diferentes plasmídeos foram preparados pré-inóculos de 200 mL de LB suplementado com 50ug/mL de canamicina. Estes pré-inóculos foram então incubados durante a noite a 37°C num agitador orbital a 130 rpm.

2.3.1. Sobre-expressão do enzima FDP

O crescimento bacteriano da estirpe que tinha sido transformada com o plasmídeo pET24 (+)_cdFDP foi realizado a 130 rpm até à OD de indução de 0.4 a 37°C, e após a indução baixou-se a temperatura para 30°C. O crescimento foi efetuado em condições aeróbicas em Erlenmeyers de 2L com 2L de meio, preparados com 400 mL de meio mínimo M9 inoculado com 2% de pré-inóculo e suplementado com 0.02 M de glucose, 0.002 M MgSO₄, 0.1 mM FeSO₄, 50ug/mL de KAN₅₀, e 0.1 μ M CaCl₂. O crescimento foi monitorizado por espectroscopia UV-VIS usando a absorvância ao comprimento de onda (λ) de 600 nm. Quando se atingiu uma OD= 0.4 a expressão foi induzida com 0.1mM de IPTG e 0.1 mM de FeSO₄. Em seguida incubou-se durante 7 horas. Passado essa etapa o meio de crescimento foi centrifugado a 7000 rpm, a 4°C durante 10 min. As células foram então recolhidas e ressuspensas em 20 mM Tris-HCl, pH7.5.

2.3.2. Sobre-expressão do enzima HMW-Rd

O crescimento bacteriano da estirpe que tinha sido transformada com o plasmídeo pET24 (+)_cdHMW foi realizado a 130 rpm até à OD de indução de 0.8 a 37°C em Erlenmeyers de 2L com 1L de meio LB inoculado com 2% de pré-inóculo e suplementado com 0.1 mM FeSO₄ e 50ug/mL de KAN₅₀, e após a indução com 0.1mM IPTG baixou-se a temperatura para 30°C e incubou-se durante 6 horas.

Passado esse tempo o meio do crescimento foi centrifugado a 7000 rpm, a 4°C durante 10min, passado esse tempo as células foram recolhidas e ressuspensas em 20mM Tris HCl, pH7.5, 18% glicerol .

2.3.3. Sobre-expressão da proteína Rd

O crescimento bacteriano da estirpe que tinha sido transformada com o plasmídeo pET24 (+)_cdRd foi realizado a 130 rpm até à OD de indução de 0.8 a 37°C.

O crescimento foi efetuado em condições aeróbicas, a 37°C e 130 rpm de agitação, em Erlenmeyers de 2L com 1L de meio preparados com 200 mL de M9 inoculado com 2% de pré-inóculo e suplementado com 0.02 M de glucose, 0.002 M MgSO₄, 0.1 mM FeSO₄, 50ug/mL de KAN₅₀ e 0.1 μM CaCl₂. O crescimento foi monitorizado por espectroscopia UV-VIS, sendo a expressão induzida quando se atingiu uma OD= 0.8 com 0.4 mM de IPTG e 0.1 mM de FeSO₄. Em seguida incubou-se durante 4 horas. Passado essa etapa o meio do crescimento foi centrifugado a 7000 rpm, 4°C durante 10 min. As células foram então recolhidas e ressuspensas em 20 mM Tris HCl, pH7.5, 10% glicerol.

2.4. Purificação das Proteínas

2.4.1- Primeiro passo da Purificação das Proteínas

Após as células terem sido recolhidas, procedeu-se à lise celular. Neste primeiro passo foi adicionado à suspensão celular 1μL de 1mg/mL de DNase, e no caso da HMW-Rd foi ainda adicionado PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) a 0.1mM, funcionando como inibidor não específico de múltiplas proteases.

Seguidamente as células foram disrumpidas utilizando uma prensa de French (3 ciclos a 1000 psi), seguindo-se a uma centrifugação com um rotor da marca *Beckman Coulter*, modelo JA25-50 (27000 g, 4°C, 20min) separando as células lisadas das intactas. A fração solúvel foi novamente centrifugada de modo a separar a parede celular do conteúdo citoplasmático, utilizando para o efeito uma ultracentrifuga com um rotor da marca da marca *Beckman Coulter*, modelo 45Ti (2 horas, 125000 g, 4°C).

A fração solúvel foi então dialisada, contra 20 mM Tris HCl, pH7.5 para a proteína rubredoxina (no caso do FDP adicionou-se 10% glicerol e no caso HMW-Rd 18% de glicerol) num volume final de 5L a 4°C durante toda a noite.

Os passos seguintes de purificação foram efetuados num sistema ÄKTA-Prime (GE Healthcare) a 4°C, e todos os tampões utilizados foram previamente filtrados (0.22μm).

2.4.2 Purificação do enzima FDP

No processo de purificação da FDP foi somente utilizada uma coluna de troca aniónica “Q-Spharose” de 160 mL, previamente equilibrada com 20mM Tris HCl, 10% glicerol a pH7.5 e realizado um gradiente linear de 0-100% de 1M NaCl, num volume final de 900 mL sendo efetuado a um fluxo de 4 mL/min. No final a amostra foi concentrada e o tampão foi permutado para 50mM Tris HCl a pH7.5, 18% glicerol.

A pureza do enzima foi analisada através de géis SDS-PAGE e por espectroscopia de absorção UV-VIS.

2.4.3 Purificação do enzima rubredoxina com alto peso molecular

No processo de purificação da HMW-Rd foi utilizada a mesma coluna utilizada para a purificação da FDP, tendo sido equilibrada com 20mM Tris HCl, 18% glicerol a pH7.5, sendo a troca efetuada graças a um gradiente de 0-50% de 1M NaCl, num volume final de 900 mL sendo realizado a um fluxo de 4mL/min. No final a amostra foi concentrada e o tampão foi permutado para 50mM Tris HCl a pH7.5, 18% glicerol.

A pureza do enzima foi analisada através de géis SDS-PAGE e por espectroscopia de absorção UV-VIS.

2.4.4 Purificação da proteína rubredoxina

Na purificação da Rd foram utilizadas duas colunas, uma primeira coluna de troca aniónica Q-Spharose de 160 mL, equilibrada com 20mM Tris HCl a pH7.5, sendo a troca efetuada a um gradiente de 0-100% 1M NaCl realizado a um fluxo de 4mL/min. A segunda coluna utilizada foi a Superdex S75, coluna utilizada para cromatografias de exclusão molecular, equilibrada com 20mM Tris HCl a pH7.5, 150mM NaCl. No final a amostra foi concentrada e o tampão foi permutado para 50mM Tris HCl a pH7.5, 10% glicerol.

A pureza da proteína foi analisada através de géis SDS-PAGE e por espectroscopia de absorção UV-VIS.

2.5 Caracterização de Proteínas

2.5.1 Determinação da concentração de proteína /ferro /flavina

A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) usando como proteína padrão albumina de soro de bovino ^[33].

As quantidades de ferro e de flavina foram determinadas através de um protocolo otimizado para este tipo de proteínas, descrito no esquema seguinte – Figura 12.

Uma dada quantidade de proteína é diluída em tampão 50 mM Tris HCl, 18% glicerol para um volume final de 400 µL, sendo adicionado 5 µL de 8 M HCL (ou no caso de rubredoxinas 50 µL) e deixando-se repousar durante 15 minutos. Em seguida é adicionado 50 µL de 5M ácido tricloroacético deixando-se repousar novamente durante 30 minutos para desnaturar completamente a proteína.

Passado esse tempo, centrifuga-se a amostra durante 5 minutos a 8000 rpm e descarta-se o pellet contendo a proteína desnaturada. É adicionado 100 µL de acetato de amónio 75% e traça-se o espectro de UV-visível e retira-se o valor de absorvância a 450 nm. Após a obtenção desse valor e utilizando a lei de Lambert-Beer e sabendo que o coeficiente de extinção molar, ϵ , da flavina é igual a $11.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, obtém-se a concentração de flavina.

Com a mesma amostra é possível determinar a concentração de ferro adicionando a metade da amostra 400 µL de hidroxilamina a 10% e 400 µL de fenantrolina a 0.3%. Durante 2 horas a amostra é mantida à temperatura ambiente e em seguida retira-se a absorvância a 510 nm e da mesma forma

utilizando a lei de Lambert-Beer e sabendo que o ϵ do complexo ferro-fenantrolina é igual a $11.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, obtém-se a concentração de ferro.

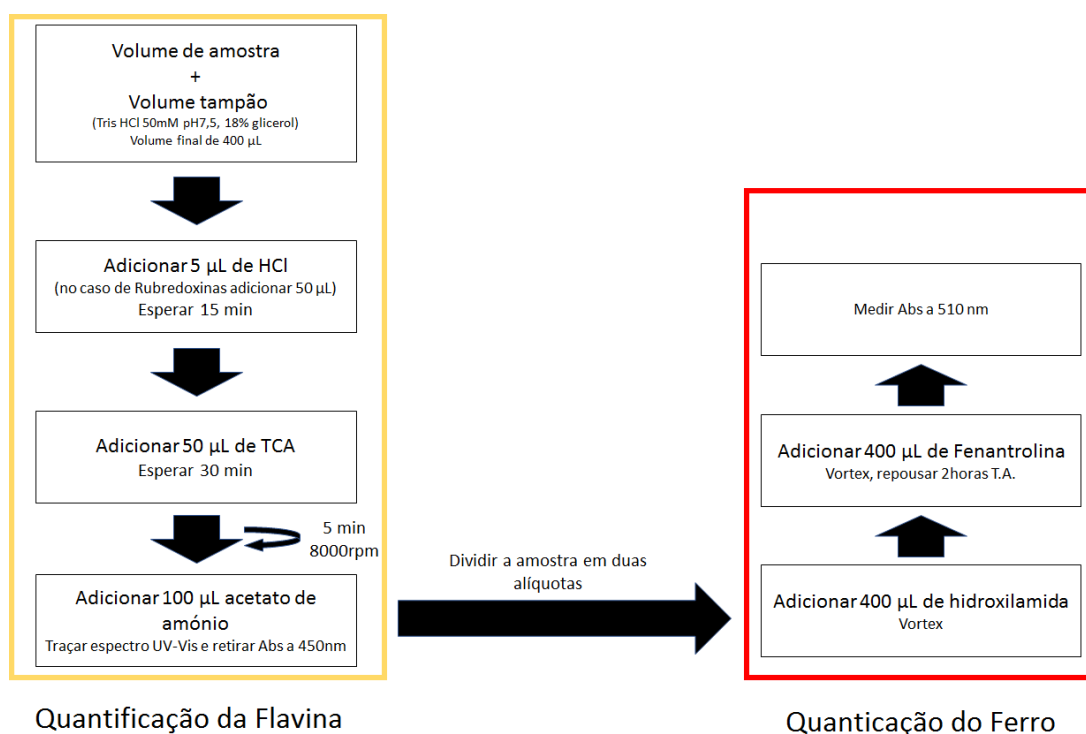


Figura 12 - Esquema para a quantificação do ferro e da flavina. Quadrado amarelo - esquema para a determinação da flavina e quadrado vermelho - esquema para a determinação do ferro

2.5.2 Determinação do estado oligomérico

Para a determinação do estado oligomérico das proteínas em estudo recorreu-se a uma coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300 GL, sendo uma coluna de exclusão cromatográfica de pequena escala utilizada para a caracterização e análise de proteínas com pesos moleculares entre os 10 e 600 KDa ^[34].

Ambas as amostras (proteína em estudo e padrões) passaram pela coluna a um fluxo de 0.75 mL/min, tendo como eluente 20mM Tris HCl a pH7.5, 150mM NaCl e o eluído foi monitorizado a 280 nm.

As amostras das proteínas foram preparadas num volume final de 500 µL a uma concentração final de 10 mg/mL, e centrifugadas a 10000g durante 10 min.

O resultado obtido foi confrontado com uma amostra padrão composta por um conjunto de compostos com a massa molecular conhecida – Tabela 1- do qual foi possível determinar a massa molecular das proteínas e desse modo prever o estado oligomérico dos mesmos.

Tabela 1 - Lista de padrões utilizados na determinação do estado oligomérico das proteínas com a referida massa molecular e concentração utilizada.

<i>Proteína</i>	M_{Molecular} (kDa)	Concentração (mg/mL)
Ferritina	440	0.3
Aldolase	158	3
Conalbumina	75	3
Anidrase carbónica	29	3
Citocromo c	12.4	3

Na figura 13-A está representado o cromatograma típico dos padrões e na figura 13-B está ilustrada a relação entre o volume eluído na coluna em relação ao Log da massa molecular das proteínas.

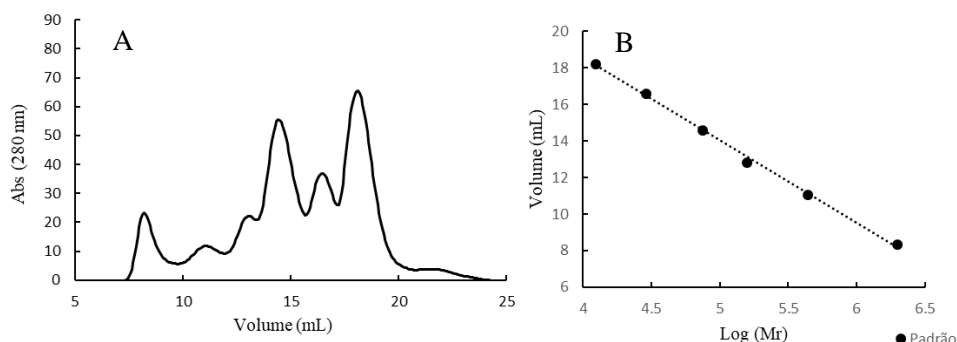


Figure 13- A) cromatograma típico dos padrões utilizado na determinação do estado oligomérico dos enzimas obtido a um fluxo de 0.75 mL/min tendo como eluente 20mM Tris HCl a pH7.5, 150mM NaCl , monitorizado a 280 nm. B) Relação entre o Log da massa molecular dos compostos e volume eluído na coluna até a saída de cada proteína.

2.5.3 Determinação do tipo de flavina

Para a determinação do tipo de flavina recorreu-se a um método cromatográfico de HPLC. A Coluna Nova Pack C18 de fase reversa foi equilibrado com 0.1M acetato de amónio pH6:metanol (95:5) e o gradiente foi realizado de 0-100% com 0.1M acetato de amónio pH6 :metanol (80:20).

A amostra proteica foi preparada para uma ter uma concentração final de 20 μ M num volume final de 200 μ L, permutada com H₂O mili-Q e filtrada (0.22 μ m). A amostra foi então aquecida a 100°C durante 20 min, e posteriormente centrifugada a 13000 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi então levado para o HPLC.

Os padrões (FAD, FMN) foram preparados a uma concentração final de 20 μ M em H₂O mili-Q e filtrados (0.22 μ m).

2.6 Cristalografia

2.6.1 Cristalografia do enzima FDP

Numa primeira fase de obtenção de cristais do enzima FDP foi utilizado o *kit Structure Screen 1 + 2 HT-96* da marca Molecular Dimensions ^[35,36]. A escolha deste kit para a primeira abordagem de cristalização deveu-se ao fato, deste apresentar uma vasta gama de variáveis de pH e agentes precipitantes, permitindo assim obter uma maior triagem de cristalização. A placa de cristalização foi feita com o auxílio do robô de cristalização da marca Digilab, modelo Honeybee X8.

Para uma maior triagem, para cada condição do kit acima mencionado foram feitas três variações de proporções de proteína contra solução de cristalização, variando-se em 1:1, 1:2, e 2:2.

A amostra do enzima foi preparada para se encontrar a uma concentração de 10 mg/mL num volume final de 200 µL, diluída em 50 mM Tris HCl pH7.5, 10% glicerol.

Com os resultados positivos obtidos na placa de cristalização foram feitos ajustes na condição de cristalização de modo a melhor a qualidade dos cristais.

2.6.2 – Cristalografia do enzima HMW-Rd

No caso da HMW-Rd, foram preparadas duas amostras distintas do enzima, sendo que uma apresentava uma concentração de 8 mg/mL diluída em 50mM Tris HCl pH7.5, 18% glicerol, 37% 150 mM NaCl e uma segunda amostra preparada a uma concentração de 16 mg/mL diluída em 50mM Tris HCl pH7.5, 4,5% glicerol.

Foi utilizado o mesmo Kit referenciado acima como primeira tentativa de cristalização, tendo-se realizado o mesmo procedimento descrito para o enzima FDP, tendo sido feitas 3 placas de cristalização uma com a primeira amostra que apresentava 10 mg/mL de proteína com 18% de glicerol, uma segunda placa com a amostra de 16 mg/mL de proteína em 4.5% de glicerol com 30% de humidade e uma terceira placa com a mesma amostra da placa anterior com 80% de humidade.

2.6.3 Cristalografia da proteína Rubredoxina

Em relação à proteína rubredoxina, realizaram-se dois procedimentos distintos devido ao fato de este tipo de proteína ser bastante estável e difícil de cristalizar.

O primeiro procedimento realizado foi idêntico ao efetuado com o enzima FDP utilizando o *kit Structure Screen 1 + 2 HT-96* da marca Molecular Dimensions ^[35,36], usando-se neste caso a proteína a uma concentração de 8 mg/mL em 50mM Tris HCl, 10% glicerol.

O procedimento seguinte foi realizado com base nos trabalhos efetuados por Siker, L. e seus colaboradores, que cristalizaram um grande numero de rubredoxinas nomeadamente Rubredoxina de *Clostridium pasterianum* e *Desulforibrio vulgaris*, através do uso de sulfato de amónio como agente cristalizante. ^[37,38]

Seguindo a metodologia desses trabalhos o tampão da proteína foi alterado, encontrando-se a proteína a uma concentração de 10 mg/mL em 0.1M citrato pH 4.

Com base nessa informação, utilizou-se o kit Grid Screen AmMonium Sulphate da marca Hampton Research, que é um kit de reagentes projetado para fornecer um rastreador rápido de condições de cristalização com base em concentrações crescentes de sulfato de amônio (0.8-3M) em diferentes valores de pH (4-9).^[39]

2.7 Métodos espectroscópicos

2.7.1 Titulações Redox

A titulação Redox foi seguida por espectroscopia de absorção UV-VIS, tendo os espectros tido sido adquiridos por um espectrofotômetro de duplo feixe, Perkin Elmer lambda 35, utilizando um eletrodo combinado de platina e Ag/AgCl previamente calibrados com uma solução saturada de quinidrona a pH 7^[8].

Estes ensaios realizaram-se à temperatura ambiente, em 50 mM Tris HCl, 18% glicerol pH7.5 em condições anaeróbicas (soluções desarejadas com um fluxo contínuo de argon) e na presença de glucose oxidase (280 nM), catalase (640 nM) e glucose (1mM), com uma concentração de proteína de aproximadamente 35 µM, na presença de mediadores redox de modo a mediar o potencial na gama de +265 mV e -275 mV^[8] e a variação do potencial foi conseguida com adições sucessivas de 0.01 mM de ditionito de sódio

Os mediadores utilizados foram (0.5 µM cada): ácido 1.2-naphtoquinona-4-sulfúrico, trimetil-hidroquinona, 1.4-naftoquinona, menadiona, plumbagina, índigo trisulfúrico, fenazina, 2-hidroxil-1.4 naftoquinona, antraquinona e tetrametil-p-fenilenodiamina^[8].

Os potenciais lidos foram posteriormente, convertidos para o potencial corrigido em relação ao eletrodo padrão de hidrogénio pela seguinte formula:

$$E^0 = E^0_{\text{Lido}} + (211 + [E_{\text{Quinidrona}} - 75]) \quad (4)$$

2.7.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrónica

Os espectros de ressonância paramagnética eletrónica (RPE) foram obtidos num espectrómetro Bruker EMX equipado com um criostato de fluxo contínuo de hélio ESR 900 da Oxford instruments a 4.6 -7 K, com uma frequência de microondas de 9.34 GHz, uma potência de 2mW e uma amplitude de modulação de 10 G.

2.7.3 Ensaios Cinéticos

Os espectros de UV-VIS seguintes, foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 e por um Diode-Array da marca Biologic. Os ensaios cinéticos foram efetuados em condições anaeróbicas, à temperatura ambiente em 50 mM Tris HCl, pH 7.5, 18% glicerol e na presença de 280 nM glucose oxidase, 640 nM catalase e 1mM glucose.

Todas as proteínas e reagentes foram desarejados para minimizar a presença de oxigénio nos ensaios.

2.7.3.1 Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd

De modo a se determinar a atividade NAD(P)H-oxidoreductase do HMW-Rd foi realizado um conjunto de ensaios nos quais se variou o tipo de aceitador de elétrons (DCPIP, '2.6 – Diclorofenolindofenol' ou Rd) e de dador de elétrons (NADPH e NADH) na presença de 0.2 μ M HMW-Rd.

No ensaio da atividade oxidoreductase com DCPIP a uma concentração de 0.05 mM, foi analisado o decréscimo da absorvância a 600 nm tendo como doador de elétrons diferentes concentrações (0 – 150 μ M) de NADPH ou NADH [27].

Em relação à atividade oxidoreductase com os doadores de elétrons NADH e NADPH (200 μ M), foi analisado o decréscimo da absorvância a 340 nm tendo como aceitador de elétrons diferentes concentrações de DCPIP (0- 150 μ M) ou Rd (0-100 μ M) [27].

2.7.3.2 Transferência eletrônica da HMW para Rubredoxinas de diferentes organismos

De modo a verificar a existência de transferência eletrônica entre o enzima HMW-Rd e rubredoxinas, realizou-se um ensaio preliminar no qual vários tipos de Rds foram incubadas com HMW-Rd na presença de 5 mM NADH sendo as cinéticas seguidas a 490 nm.

Neste ensaio foram utilizadas rubredoxinas de vários organismos: domínio rubredoxina da flavorubredoxina de *E.coli*, rubredoxina de *Archaeoglobus fulgidus* tipo 1, rubredoxina de *Archaeoglobus fulgidus* tipo2, rubredoxina de *Pyrococcus furiosus* e rubredoxina de *Clostridium difficile* (Rd-Cd).

Foi também realizado em paralelo um alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da Rd de *C.difficile* contra a sequência de um conjunto de rubredoxinas de vários organismos com o objetivo de se verificar a semelhança entre elas.

2.7.3.3 Transferência eletrônica entre as três proteínas (HMW-Rd; Rd; FDP)

Em continuação dos ensaios realizados no tópico acima tentou-se verificar a existência de transferência eletrônica ao longo do possível mecanismo de redução do O₂ e do NO. Para tal, testou-se as proteínas HMW-Rd (5 e 20 μ M) e Rd de *C. difficile* (20 μ M) de modo a observar a capacidade de reduzir FDP (20 μ M) na presença de 1 mM NADH.

Estes ensaios foram realizados num aparelho Shimadzu UV-1800 ao longo de 30 min.

2.7.3.4 Transferência eletrônica na redução do O₂ e do NO

Após se ter confirmado a existência de transferência eletrônica ao longo da cadeia testou-se a possível redução tanto do oxigênio como do óxido nítrico. Para isso, utilizou-se 5 μ M de HMW-Rd e 20 μ M de Rd e FDP na presença de 1 mM NADH e foi adicionado tampão (50 mM Tris HCl pH7.5, 18% glicerol) saturado com O₂ ou NO.

Estes ensaios foram também realizados no aparelho de Diode-Array. Nos ensaios que se analisou a redução do oxigénio por parte das enzimas não foi adicionado glucose oxidase, glucose para não influenciar os resultados.

2.8 Métodos Amperométricos

Antes dos ensaios amperométricos foi realizado um alinhamento múltiplo da sequencia do FDP com outros FDPs para os quais se conhecia o substrato específico (O_2 e/ou NO) ^[31].

Para tal, utilizou-se FDP de *G.intestinalis* (PDB=2Q9U), de *T.maritima* (PDB=1VMEA), *M.marburgensis* (PDB=2OHI) que são seletivos para oxigénio, *E.coli* FDP-D (PDB=4D02) descrito como sendo seletivo para o NO e ainda *M.thermoacetica* (PDB=1YCFC) e de *D.gigas* (PDB=1E5DA) que não são seletivos para nenhum dos substratos ^[31].

Após a verificação pela sequencia de qual o substrato preferencial do enzima foi verificado a sua atividade das para o consumo dos substratos oxigénio e NO através de ensaios amperométricos.

2.8.1 Consumo de oxigénio

Nos ensaios em que se tinha como objetivo verificar o consumo de oxigénio do sistema utilizou-se o aparelho de respirometria de alta resolução – Oroboros Intruments Oxy-graph 2K, equipado com um elétrodo de Clark.^[40]

O elétrodo de Clark é um elétrodo constituído por um cátodo, geralmente composto por ouro, e um ânodo formado por um elétrodo de Ag/AgCl, ambos mergulhados em uma solução KCl. Este elétrodo em solução atinge um potencial de aproximadamente os 800 mV.

Estes ensaios foram realizados à temperatura ambiente em 50 mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol .

2.8.1.1 Consumo de oxigénio pelas enzimas

Nesta fase analisou-se o consumo de oxigénio por parte das diferentes proteínas de modo a verificar o seu possível papel no organismo.

Para isso foram realizados ensaios nos quais se variou a concentração das proteínas de modo a tentar perceber a contribuição de cada uma no consumo de oxigénio.

As enzimas foram adicionadas sempre na mesma ordem e só se variou a concentração de uma das proteínas em cada ensaio. As proteínas foram adicionadas da seguinte forma: HMW-Rd (0-20 μ M), Rd (0- 200 μ M) e FDP (0-20 μ M) sempre na presença de 5 mM NADH, 7 nM catalase e 1.3nM SOD- Figura 14.

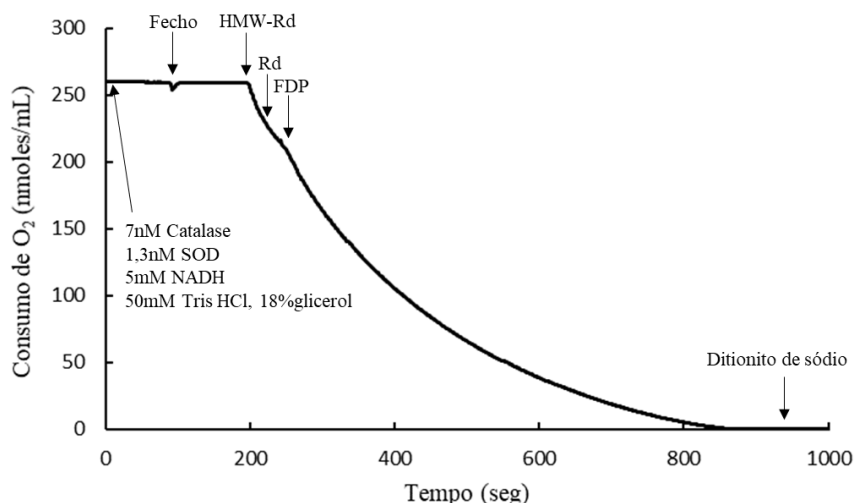


Figura 14 - Ilustração da metodologia utilizada nos ensaios realizados para a determinação da redução de oxigénio pelas proteínas

2.8.2 Consumo de óxido nítrico

Nos ensaios em que se tinha como objetivo verificar o consumo de NO do sistema utilizou-se o aparelho de deteção de radicais livres - Apollo 4000, acoplado a um elétrico específico para a deteção de óxido nítrico.

Estes ensaios foram realizados à temperatura ambiente em 50 mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol, 20μM EDTA e na presença de catalase (130 U/mL), glucose (10 mM) e glucose oxidase (4U/mL).

2.8.2.1 – Consumo de óxido nítrico pelos enzimas

O consumo de NO por parte das diferentes proteínas foi avaliado realizando ensaios nos quais se variou a concentração do enzima FDP de modo a tentar perceber a contribuição deste no consumo de óxido nítrico.

As proteínas foram adicionadas sempre na mesma ordem e só se variou a concentração de FDP (0-1.2 μM). As proteínas foram adicionadas da seguinte forma: HMW-Rd (0.5μM), Rd (20 μM) e FDP (0-1.2μM) na presença de 5 mM NADH, como demonstrado na Figura 15.

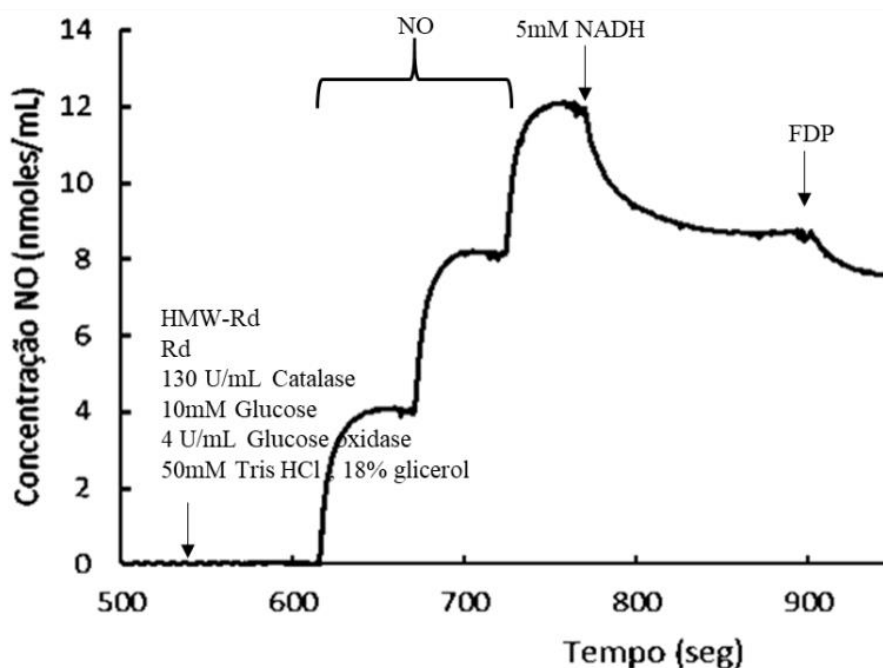


Figura 15 - Ilustração da metodologia utilizada nos ensaios realizados para a determinação da redução do NO pelas proteínas

2.9- Atividade peroxidase do FDP

Por ultimo e com o objetivo de avaliar a atividade do enzima FDP para um terceiro substrato, o peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , realizou-se um conjunto de ensaios nos quais se variou a concentração de H_2O_2 de modo a se observar o consumo do NADH pelas enzima fase à variação de concentração do substrato.

Os ensaios foram seguidos a 340 nm utilizando um espectrofotómetro da marca Shimadzu UV-1800 em condições anaeróbias. As proteínas foram adicionadas sempre na mesma ordem e só se variou a concentração de substrato (0-10 mM). As proteínas foram adicionadas da seguinte forma: HMW-Rd ($5\mu M$), Rd ($5\mu M$) e FDP ($5\mu M$) sempre na presença de $200\mu M$ NADH, como demonstrado na Figura 16.

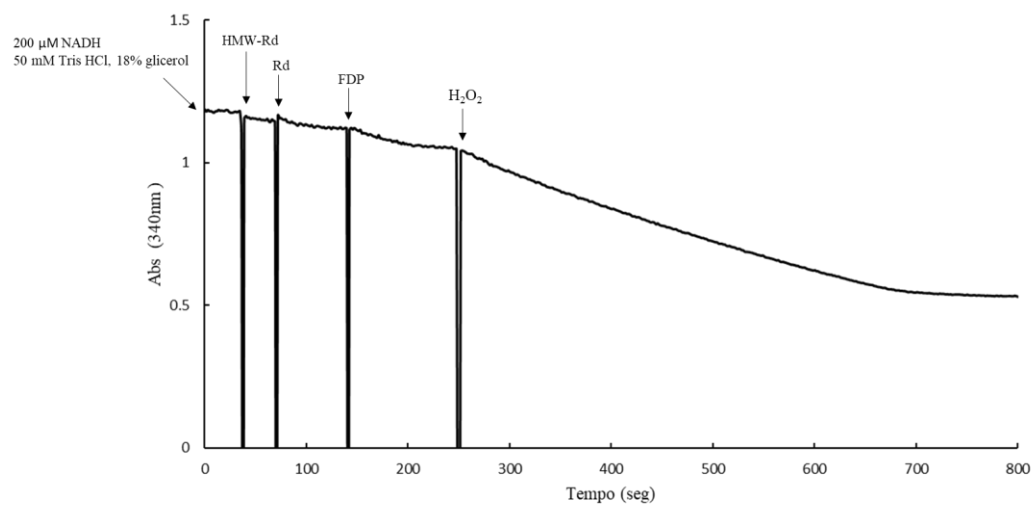


Figura 16 - Ilustração de um ensaio modelo realizado para a determinação da atividade peroxidase do FDP.

Parte III

Resultados/Discussão

3. Resultados/Discussão

3.1 Testes de expressão e purificação das proteínas

3.1.1 Testes de expressão da enzima HMW-Rd

Os testes de expressão efetuados para o enzima HMW-Rd, apresentaram resultados positivos em todas as condições testadas, – Figura 17, visto que em todas as amostras existe uma banda de expressão predominante localizada entre as bandas de 31 e 21.5kDa do marcador (Biorad LMW ‘low-Ranger SDS-PAGE Standards’) correspondente à proteína de interesse, sendo o tamanho esperado, de 23kDa.

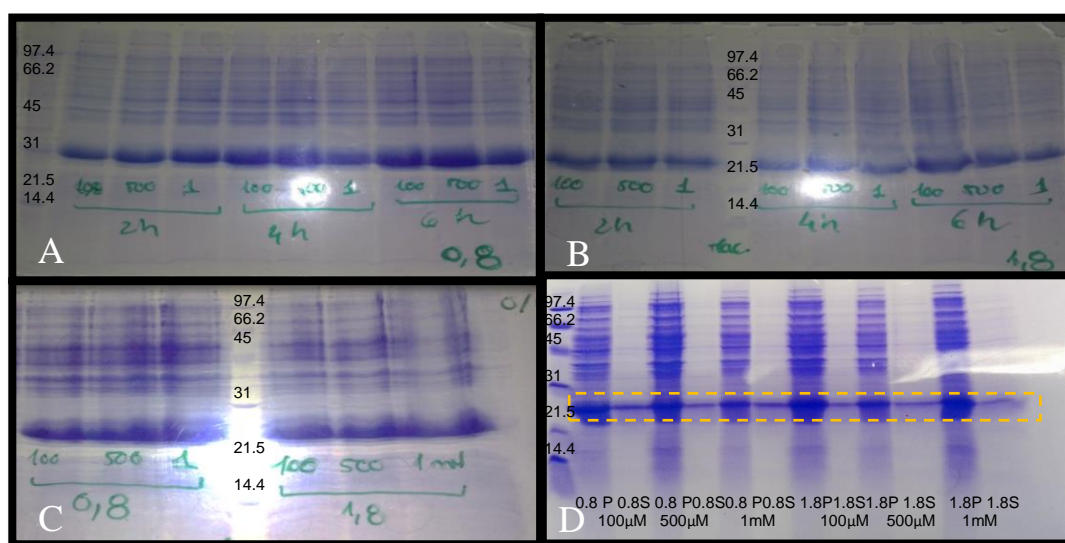


Figura 17- SDS -PAGE 15% das amostras dos testes de expressão de HMW-Rd. A) Amostras dos crescimentos induzidos a uma densidade óptica (O/D) de 0.8 com concentrações de IPTG de 0.1 a 1 mM, às 2, 4 e 6 horas após indução . B) Amostras dos crescimentos induzidos a uma (O/D) de 1.8 com concentrações de IPTG de 0.1 a 1 mM, às 2, 4 e 6 horas após indução. C) Amostras dos crescimentos recolhidas após um teste decorrido durante toda a noite induzidos a uma densidade ótica (O/D) de 0.8 e 1.8 com concentrações de IPTG de 0.1 a 1 mM. D) Solubilidade do enzima nas diferentes condições testadas recolhidas após um crescimento durante toda a noite, tendo sido aplicadas no gel amostra do pellet (P) e do sobrenadante (S)

Após uma análise de todas as condições testadas, apurou-se que a melhor condição de expressão foi analisada quando o crescimento era induzido a uma densidade ótica de 0.8, sendo indiferente a concentração de IPTG utilizada para a indução tendo o crescimento durado 6 horas após as células terem sido induzidas -Figura 17A.

Como a concentração de IPTG foi indiferente para a qualidade de expressão da proteína utilizou-se uma concentração de 0.1mM de IPTG na expressão da mesma, devido ao fato deste em elevadas concentrações ser tóxico para a célula.

No que diz respeito à solubilidade da proteína, – Figura 17 D – conclui-se que a mesma se encontrava solúvel em todas as condições testadas, sendo que as amostras foram recolhidas depois de um crescimento que decorreu durante toda a noite.

3.1.2 Purificação das proteínas

3.1.2.1 - Proteína Flavodiférrica (FDP)

O cromatograma da passagem do enzima na coluna de Q-Spharose está representado na figura 18, na qual se pode observar que a 50% do gradiente de 0-1M NaCl existe uma banda de absorvância máxima a 280 nm correspondente à eluição da proteína na coluna.

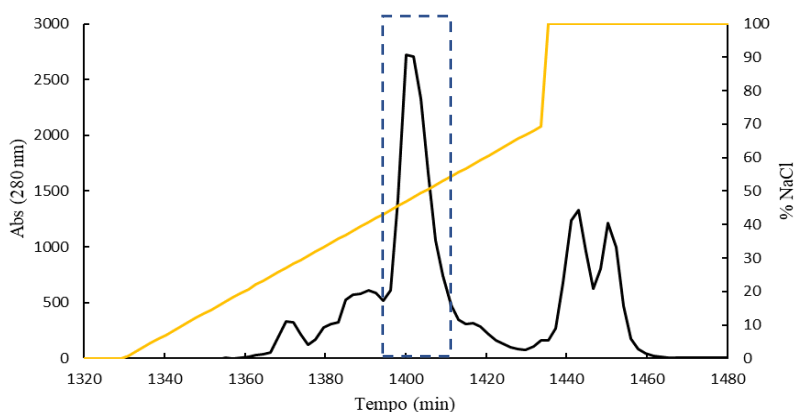


Figura 18 - Cromatograma obtido a 280nm na purificação do enzima FDP, representado a separação de diferentes proteínas à saída da coluna Q-Spharose (linha preta) ao longo de um gradiente de 0-1M NaCl, (linha amarela).

Devido à fragilidade da proteína em reter os cofatores, o enzima não foi sujeita à passagem noutra coluna, para uma purificação mais eficiente.

Como o enzima após se ter realizado as quantificações de proteína, ferro e flavina apresentava resultados muito inferiores ao esperado para este tipo de enzima, foi realizado uma reconstituição de modo a se tentar completar a proteína com ferro e flavina. Deste modo foi incubada durante 24 horas com FeSO_4 e FMN 5x mais concentrados em relação à quantidade de proteína, na presença de 0.5 M ditioneitol (DTT). Após esse tempo a proteína foi centrifugada a 7000 rpm, durante 10 min a 4°C, e o tampão foi permutado para 50 mM Tris Hcl pH7.5, 18% glicerol, com o auxílio de um centricon com o objetivo de remover o excesso de cofatores.

Os espectros de UV-VIS das frações inicial e final após reconstituição estão representados na figura 19, podendo-se observar que após este processo o enzima pelos cofatores o razão de absorvância A_{280}/A_{450} passou de 15.4 para 8.1 e que a razão ferro/proteína e flavina/proteína foi concordante com proteínas deste tipo, apresentando cerca de 2 ferros por proteína e 1 flavina por proteína.

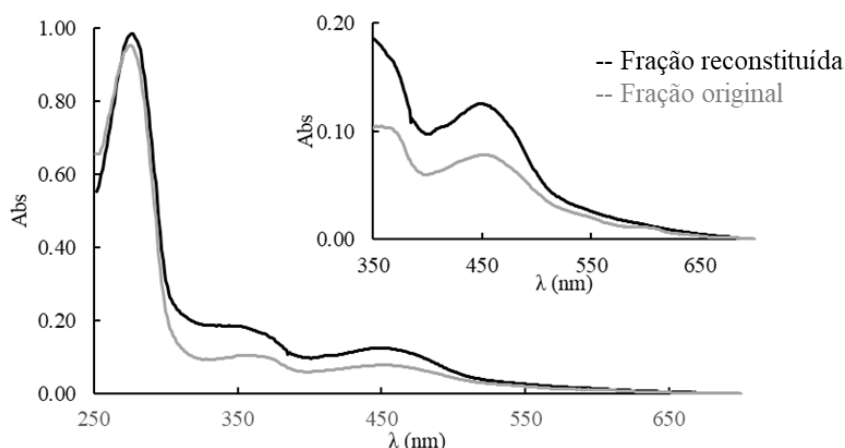


Figura 19 – Espectros de absorção UV-VIS da fração obtida na coluna Q-Spharose (linha cinzenta) e da fração reconstituída com Fe e flavina (linha preta) em tampão 50mM Tris HCl pH7.5 + 18% glicerol no estado oxidado

No final foi realizado um gel de SDS-PAGE com todas os passos de purificação para verificar o seu estado pureza -Figura 20 A- podendo se observar que a proteína apresenta o tamanho esperado de 45 kDa. A amostra da fração final está representada na figura 20 B exibindo uma tonalidade laranja, da possível contribuição da flavina e dos dois ferros.

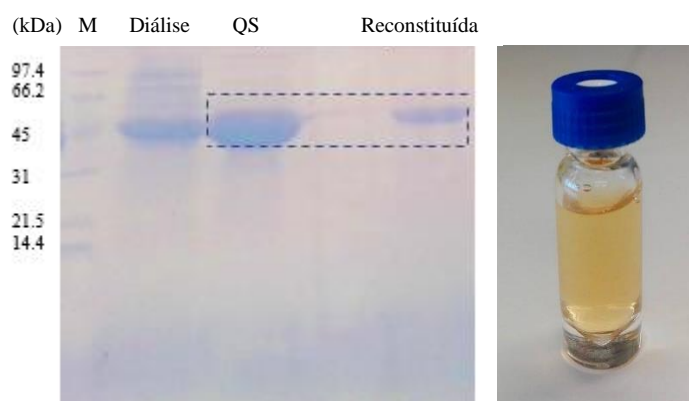


Figura 20 A) SDS-PAGE 15% das amostras recolhidas na após diálise (D), fração obtida na Q-Spharose (QS) e após reconstituição. B) Fração final em tampão 50mM Tris-HCl pH7.5 + 18% glicerol.

3.1.2.2 Rubredoxina com alto peso molecular (HMW-Rd)

No caso da HMW-Rd foi estimado também o ponto isoelétrico, a partir da sequência, obtendo-se um valor de 5.2. Deste modo realizou-se o mesmo procedimento de purificação da coluna de troca aniônica.

O cromatograma da passagem do enzima na coluna está representado na figura 21, observando-se que apesar de ter sido a primeira coluna de purificação, conseguiu-se separar muitos contaminantes ao longo do gradiente. Independentemente de não haver uma banda de absorção máxima, conseguiu-se detetar a fração correspondente à proteína de interesse pela cor observada nos tubos de ensaio recolhidos no final, verificando que o enzima eluiu da coluna a 35% do gradiente efetuado.

Devido à mesma razão do enzima FDP, a HMW-Rd não foi sujeita à passagem noutra coluna.

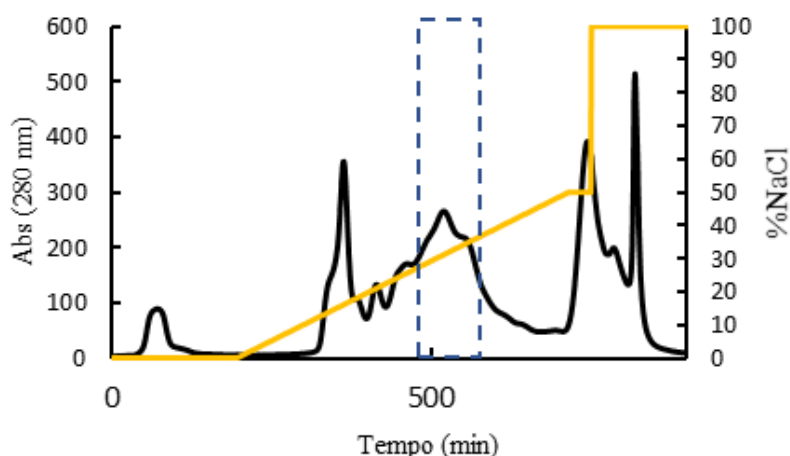


Figura 21 Cromatograma obtido a 280nm na purificação do enzima HMW-Rd, representado a separação de diferentes proteínas à saída da coluna Q-Spharose (linha preta) ao longo de um gradiente de 0-1M NaCl, (linha amarela)

Após a passagem pela Q-Spharose obtiveram-se 4 frações que diferiam entre si pela presença ou ausência de cofatores (ferro e flavina) -Figura 22 – observando-se que os espectros de UV-VIS apresentam diferenças de fração para fração, sendo que as maiores alterações são verificadas nas frações I, III e IV. A fração I não apresenta absorção a 450nm correspondente à flavina apresentando na sua constituição somente o ferro como cofator exibindo a amostra uma coloração com uma tonalidade rosa. Em relação à fração III, apresenta bandas de absorção a 450 nm correspondente ao cofator flavina e a 490/570 nm correspondente ao centro rubredoxina, apresentando deste modo os dois cofatores do enzima. A fração IV ao contrario da fração I apresenta uma banda de absorção a 450 nm correspondente à flavina, porém apresenta muito pouca absorção a 570 nm o que indica que o centro rubredoxina não tem ferro no seu centro; neste caso a amostra apresenta uma tonalidade amarela correspondente à presença dominante do cofator flavina.

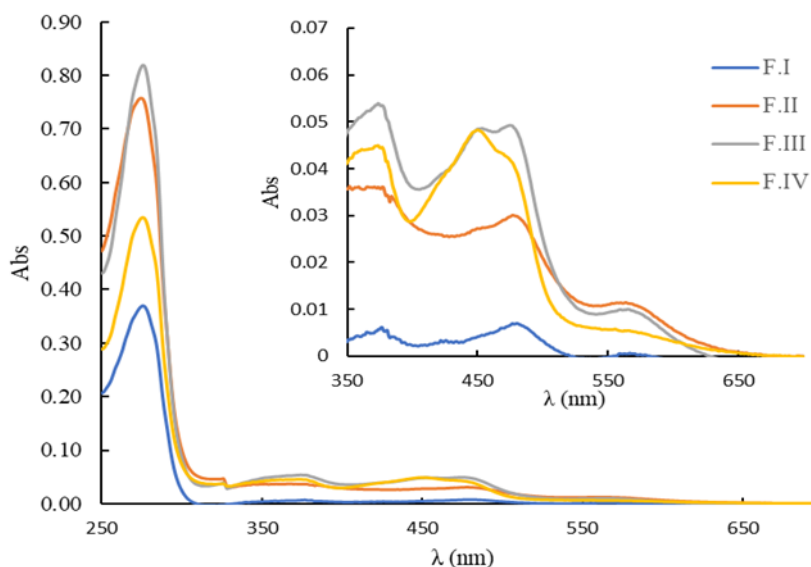


Figura 22 – Espectros de absorção UV-VIS das 4 frações do HMW-Rd nativas obtidas após passagem pela coluna Q-Spharose em 50mM Tris HCl pH7.5 + 18% glicerol no estado oxidado.

Embora todas as frações apresentassem o tamanho esperado (23 kDa) – Figura 23A -, somente a fração II e III apresentam pelo espectro a presença dos dois cofatores ^[20]. Embora tanto a fração II como III apresentassem o enzima completo a fração II encontrava-se muito impura após a passagem na Q-Spharose, por esse motivo utilizou-se a fração III para a realização dos ensaios seguintes. No final da eluição da Q-Spharose foi permutado o tampão das quatro frações para 50 mM Tris HCl pH7.5 + 18% glicerol. Na figura 23B está ilustrada a fração III final do enzima apresentando uma coloração alaranjada correspondente às contribuições do cofator flavina e do centro rubredoxina.

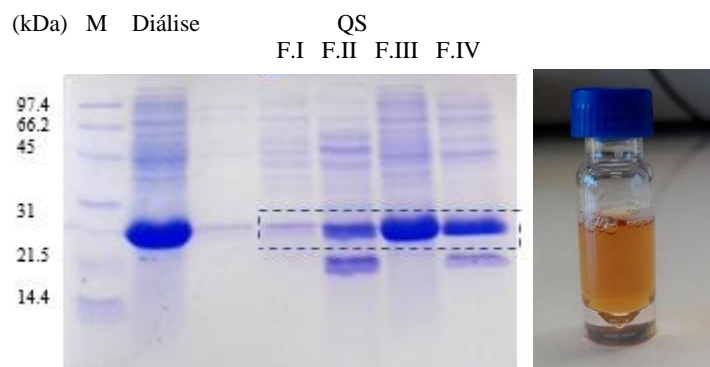


Figura 23-A) SDS -PAGE 15% das amostras recolhidas após diálise e das frações obtidas na Q-Spharose (QS). B) Fração final em 50mM Tris-HCl pH7.5 +18% glicerol.

Os resultados obtidos vão de encontro com os resultados apresentados para um enzima homólogo ao HMW-Rd de *Morella thermoacetica*, verificando-se uma ausência de banda de absorção a 490 e a 570 nm quando o centro rubredoxina contém zinco -Figura 22, Fração IV- em vez de ferro. ^[20]

3.1.2.3 Rubredoxina de *Clostridium difficile* (Rd)

A rubredoxina passou por 2 passos de purificação, tendo sido realizado uma diálise, seguida de uma coluna de troca aniônica Q-Spharose e por fim uma coluna de exclusão molecular Superdex S75

Antes de passar na Q-Spharose foi determinado também o ponto isoelétrico da proteína para se escolher o tipo de resina a utilizar e o tipo de gradiente a efetuar. Foi determinado um ponto isoelétrico de 4.0 para a proteína, do mesmo modo das anteriores, tendo-se utilizado a amostra a um pH 7.5 numa coluna equilibrada com 20mM Tris HCl, 10% glicerol a pH7.5.

O cromatograma da passagem da proteína na coluna Q-Spharose está representado na figura 24 A, no qual se pode observar que a 30% do gradiente efetuado existe uma banda de absorvância máxima a 280 nm correspondente à eluição da proteína da coluna.

Essa fração foi posteriormente concentrada e injetada na coluna de exclusão molecular Superdex S75 – Figura 24 B; ao longo das três injeções efetuadas observou-se uma banda predominante a 280 nm correspondente à saída da proteína de interesse da coluna. No final concentraram-se as três frações e permutou-se o tampão para 50mM Tris HCl pH7.5 + 10% glicerol e avaliou-se o seu estado de pureza.

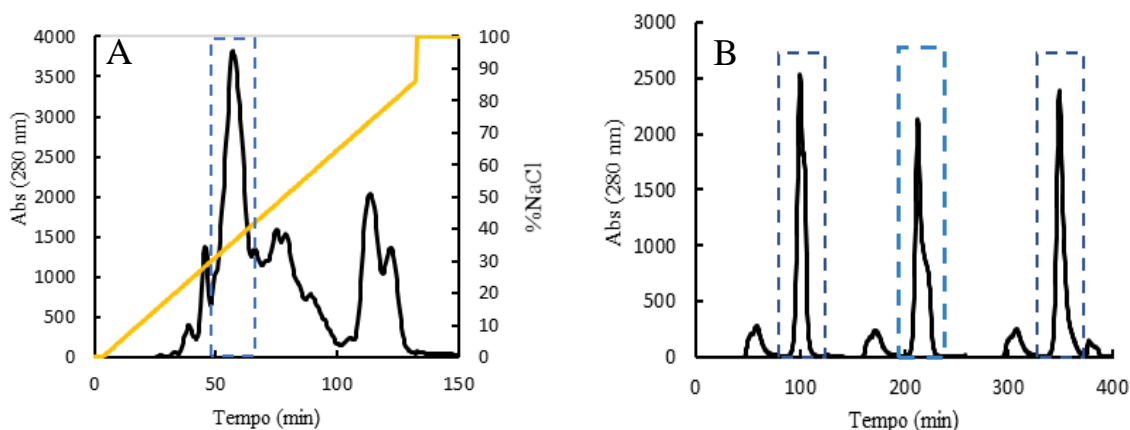


Figura 24 – A) Cromatograma obtido a 280nm na purificação da proteína Rd, representado a separação de diferentes proteínas à saída da coluna Q-Spharose (linha preta) ao longo de um gradiente de 0-1M NaCl, (linha amarela). B) Cromatograma obtido a 280nm na purificação da proteína Rd, representado as três injeções e separação de diferentes proteínas à saída da coluna SuperdexS75 (linha preta)

Obteve-se uma fração com um espectro de UV-VIS característico de rubredoxinas ^[19] – Figura 25 – com bandas de absorção a 350, 380, 490 e 570 nm

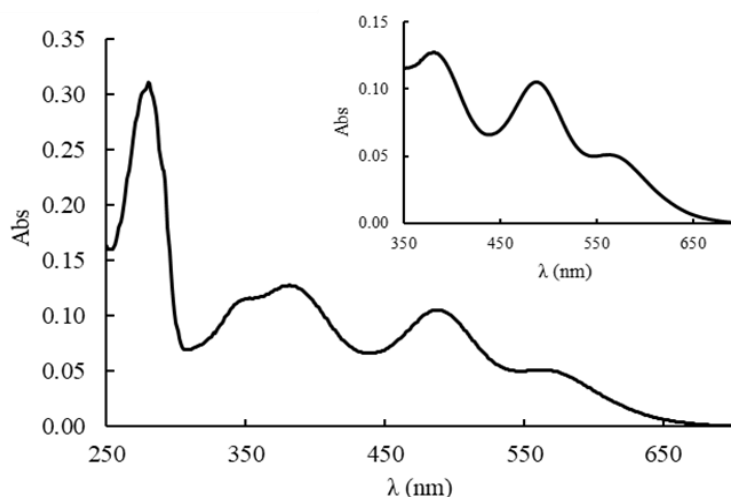


Figura 25- Espectro de Absorção UV-VIS da rubredoxina oxidada de *C.difficile* em 50mM Tris HCl pH7.5 + 10% glicerol, exibindo as bandas de absorção máximas características de proteínas deste tipo.

O grau de pureza foi analisado também por SDS-PAGE, concluindo-se deste modo, que a proteína após a passagem na coluna de exclusão molecular ficou pura, resultando numa única banda abaixo dos 14.4 kDa – Figura 26 A- sendo que a massa molecular esperada através da sequência de aminoácidos é igual a 5.85 kDa. A fração final da amostra proteica está representada na figura 26 B apresentando uma tonalidade vermelho escuro.

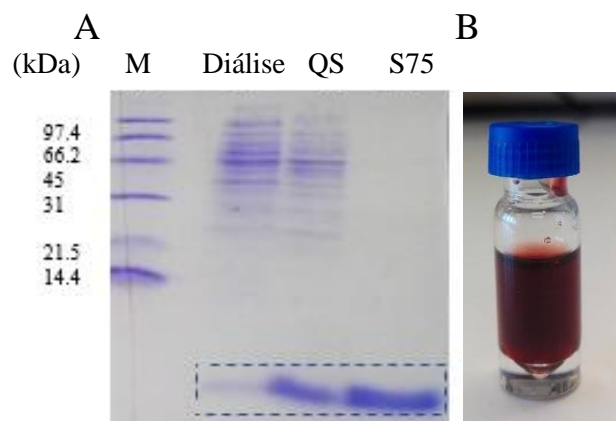


Figura 26- A) SDS –PAGE a 15% das amostras recolhidas a após diálise, fração obtida na Q-Spharose (QS) e obtida na Superdex S75(S75). B) Fração final em 50mM Tris-HCl pH7.5 +10% glicerol.

3.2 – Caracterização das proteínas

3.2.1 -Quantificações

De acordo com as características de cada uma das proteínas é expectável que a proteína flavodiférrica apresente 1 flavina e dois ferros por monómero^[28], a HMW-Rd exiba a presença de 1 flavina e de 1 ferro,^[20] e a rubredoxina 1 ferro por proteína^[19]. Na tabela 2 encontra-se um resumo das quantificações das três proteínas.

Tabela 2 -Quantificação das proteínas em relação a concentração de proteína, ferro e flavina.

	[Proteína] μM	Fe/Proteína	Flavina/ Proteína	Rendimento (mg/L crescimento)
<i>Rd</i>	1315	1.25	-	56
<i>HMW-Rd</i>	996	0.25	0.12	13
<i>FDP</i>	339	2.53	0.83	18

As quantificações de Rb e de FDP estão de acordo com o valor esperado, porém no caso do HMW-Rd a quantificação de ferro e flavina por proteína não foi o mais correto, podendo ser uma das causas a má quantificação deste enzima devido ao fato da proteína ainda se encontrar impura subestimando a quantificação da mesma, ou poderá ter havido uma incompleta incorporação dos cofatores.

3.2.2 – Determinação do estado oligomérico

3.2.2.1 – Determinação do estado oligomérico do FDP

Para a determinação do estado oligomérico da proteína flavodiférrica, a proteína foi eluída numa coluna analítica de exclusão molecular Superdex 200 10/300GL; a coluna foi calibrada com várias proteínas de massa molecular conhecida.

Deste modo, foi possível determinar uma massa molecular para a FDP de 175.kDa – Figura 27. Como cada monómero da FDP apresenta uma massa molecular de 44.9 kDa com base na sequência primária da proteína, os dados indicam que em solução está presente um tetrâmero, tal como acontece, por exemplo, com as FDPs de *Clostridium acetobutylicum* e *Giardia intestinalis*^[3].

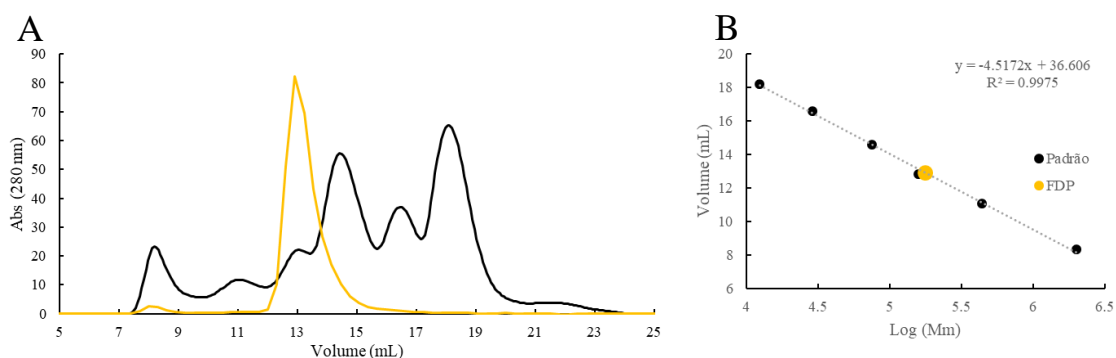


Figura 27- A) Cromatograma obtido a uma absorvância de 280 nm da eluição da FDP (linha amarela) e da mistura de padrões (linha preta) na coluna analítica Superdex200 10/300GL. B) Reta de calibração contendo o Log das massas moleculares dos padrões conhecidos (pontos pretos) e da massa molecular da amostra (ponto amarelo)

3.2.2.2 – Determinação do estado oligomérico do enzima HMW-Rd

Do mesmo modo, para a HMW-Rd, obteve-se uma massa de 51,5 kDa - Figura 28, o que é compatível com a presença de um homodímero (massa estimada de cada monómero é de 23.5 kDa), tal como descrito para a proteína homóloga de *Morella thermoacetica* ^[20].

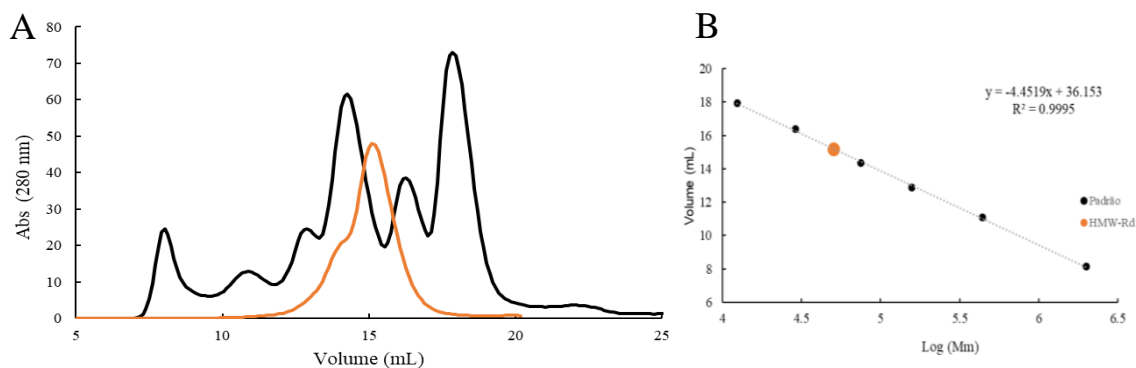


Figura 28- A) Cromatograma obtido a uma absorvância de 280 nm da eluição do HMW-Rd (linha laranja) e do padrão (linha preta) na coluna analítica Superdex200 10/300GL. B) Reta de calibração contendo o Log das massas moleculares dos padrões conhecidos (pontos pretos) e da massa molecular da amostra (ponto laranja)

3.2.3 – Determinação do tipo de Flavina

Tanto o FDP como o HMW-Rd apresentam um cofator de flavina na sua estrutura. De modo a determinar o tipo de flavina presente nos dois enzimas foi realizado uma cromatografia de HPLC, utilizando uma coluna de fase reversa.

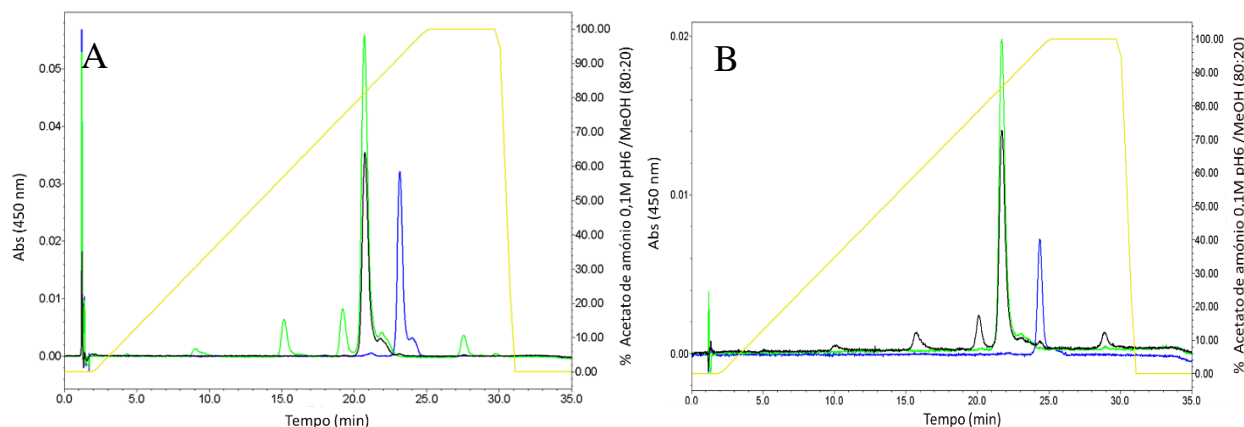


Figura 29- Cromatogramas utilizados para a determinação do tipo de flavina presente no HMW-Rd (A) e na FDP (B) (linha verdes), usando FAD (linha azul) e FMN (linha preta) como padrões. Eluição mediante um gradiente 0-100% de acetato de amônio 0.1M:MeOH (80:20) (linha amarela), seguido a uma absorvância de 450nm.

Em ambos os enzimas a flavina correspondente foi FMN (Mononucleótido de flavina) apresentando um tempo de retenção de 22 min equivalente ao tempo de retenção observado para o padrão de FMN- Figura 29

3.2.4 – Cristalografia

3.2.4.1 – Cristalografia da proteína Flavodiférrica

Ao se ter utilizado o kit *Structure Screen 1+2 HT-96* como referido nos Materiais e Métodos verificou-se que em duas condições principais houve a formação de cristais, porém na condição que tinha como agente cristalizante 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 20% PEG 8000 na proporção 1:1., os cristais resultantes apresentavam um aspeto mais abundante e robusto- figura 30 - exibindo uma forma de agulhas muito finas.

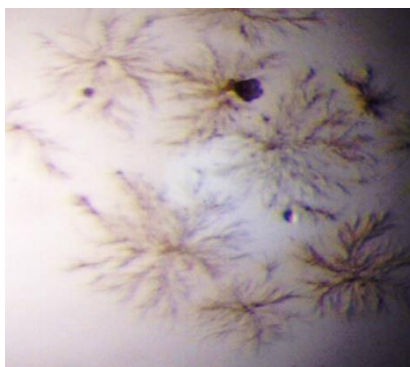


Figura 30 – Cristais do enzima FDP obtidos na condição de cristalização 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 20% PEG 8000 na proporção 1:1

No esforço de se tentar melhorar a forma dos cristais variou-se a percentagem de PEG8000 (10 - 30 % PEG8000), com e sem hexamina de cloreto de cobalto (III) e incubou-se as placas de cristalização a 20 e a 30 °C.

Com essas alterações conseguiu-se alterar o aspeto e a forma dos cristais - Figura 31 – obtendo-se agulhas mais grossas e maiores – Figura 31A – na condição de cristalização, 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 15% PEG 8000 na proporção 1:1 a 20°C, bastonetes- Figura 31B - na condição de cristalização, 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 14% PEG 8000 na proporção 1:1 a 20°C e placas em forma de losango exibindo uma coloração alaranjada – Figura 31C – na condição, 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 13% PEG 8000 na proporção 1:1 a 30°C.

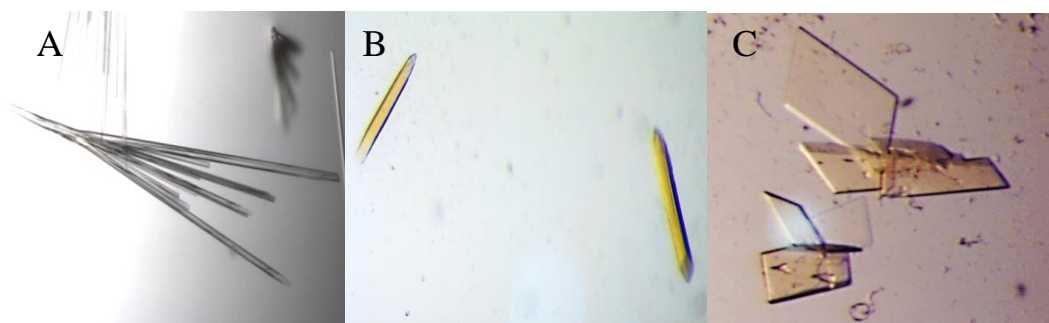


Figure 31 – Cristais do enzima FDP. A) Cristais obtidos na condição de cristalização 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 15% PEG 8000 na proporção 1:1 a 20°C. B) Cristais obtidos na condição de cristalização 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 14% PEG 8000 na proporção 1:1 a 20°C. C) Cristais obtidos na condição de cristalização 0.2M acetato de magnésio, 0.1M cacodilato de sódio pH6.5, 13% PEG 8000 na proporção 1:1 a 30°C.

3.2.5– Estruturas obtidas por homologia

3.2.5.1 – Estrutura da FDP obtida por homologia

Com a sequência de aminoácidos do FDP recorreu-se a ferramenta *online* PHYRE2 ^[41] disponibilizada em www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index, de modo a se criar um modelo da estrutura da rubredoxina com base na homologia com outras proteínas com estrutura conhecida.

Com a sequência da FDP, obteve-se um modelo para a FDP de *Clostridium difficile* construído por homologia com a estrutura do homodímero da FDP classe A de *Moorella thermoacetica* (PDB=1ycg), apresentando 100% de confiança e 40% de identidade.

Como a estrutura criada não apresentava os cofatores (FMN e ferros) na estrutura do enzima para tal, sobrepôs-se a estrutura do homodímero da FDP classe A de *Moorella thermoacetica* (PDB=1ycg) e retiraram-se as coordenadas tanto da flavina como dos dois ferros, obtendo-se desse modo a estrutura modelo ilustrada na figura 32

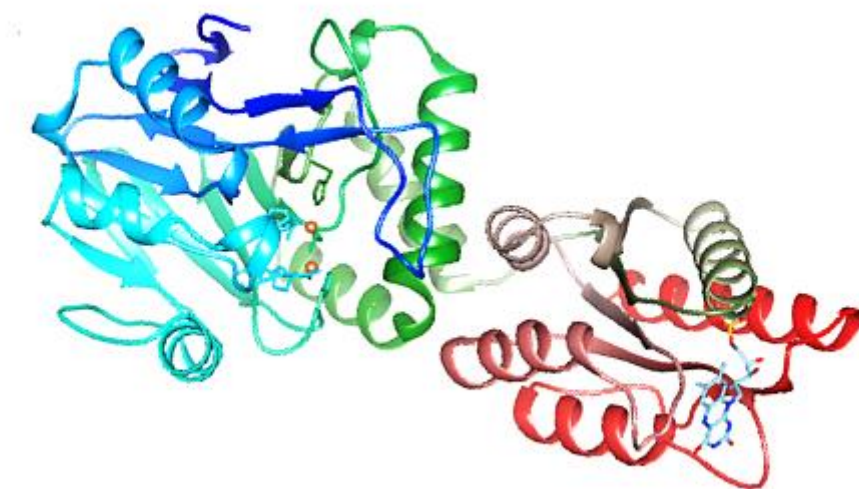


Figura 32 - Estrutura do homodimero da FDP de *Clostridium difficile* construído por homologia através do programa PHYRE2 utilizando como proteína modelo com a estrutura do homodimero da FDP classe A de *Moorella thermoacetica* (PDB=1ycg)

3.2.5.2 – Estrutura da rubredoxina obtida por homologia.

O resultado obtido foi a estrutura representada na Figura 33 - construída com base na estrutura de rubredoxina de *Desulforibrio vulgaris*- Miyazaki f. (PDB: 2rdv), tendo uma identidade de 42% com 99.9% de confiança.

Como a proteína obtida não possuía as coordenadas do Fe na proteína, sobrepôs-se a estrutura da rubredoxina de *C. difficile* obtida por homologia com a estrutura da rubredoxina de *Desulforibrio vulgaris*- Miyazaki f. e retirou-se as coordenadas do Fe acrescentou-se à rubredoxina de *C.difficile*.

O PDB final foi ajustado com auxílio do programa Coot, de modo às cisteínas ficarem direcionadas para o Fe ^[42].

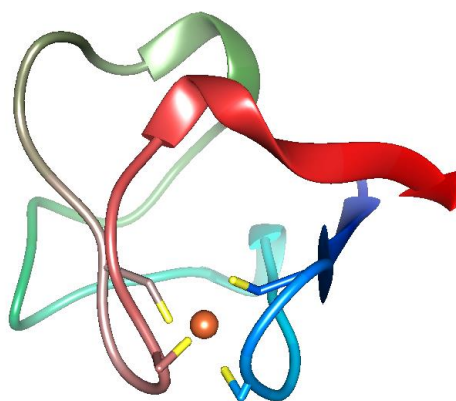


Figura 33 -Estrutura da rubredoxina de *Clostridium difficile* obtida por homologia com a rubredoxina de *Desulforibrio vulgaris*- Miyazaki f. (PDB: 2rdv)

3.3 – Ensaios espectroscópicos

3.3.1 – Titulações Redox

Com o objetivo de se determinar o potencial da transição do estado oxidado para o estado reduzido das proteínas foram realizadas titulações redox. O potencial foi medido com um eletrodo de platina e Ag/AgCl sendo posteriormente corrigido para o eletrodo de hidrogénio padrão. O potencial da proteína foi então determinado através da equação de Nernst (5).

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \log \frac{[\text{Estado Oxidado}]}{[\text{Estado Reduzido}]} \quad (5)$$

E – Potencial

E° - Potencial lido

R – Constante dos gases perfeitos

n- Numero de eletrões

F – Constante de Faraday

3.3.1.1 – Titulação Redox do enzima FDP

No caso do FDP, a redução observada é atribuída somente ao cofator FMN, devido ao coeficiente da absorção do centro binuclear (Fe-Fe) ser demasiado baixo e por esse motivo negligenciado.

A redução da flavina oxidada depende dos motivos estruturais das proteínas, porque apesar da flavina ser reduzida completamente com dois eletrões (hidroquinona), esta pode apresentar um estado semi-reduzido (semiquinona) quando reduzida com um só eletrão. A semiquinona de flavina pode ser protonada (semiquinona azul) ou desprotonada (semiquinona vermelha), sendo que essa distinção da semiquinona é dependente do seu meio envolvente ^[43,44] – Figura 34.

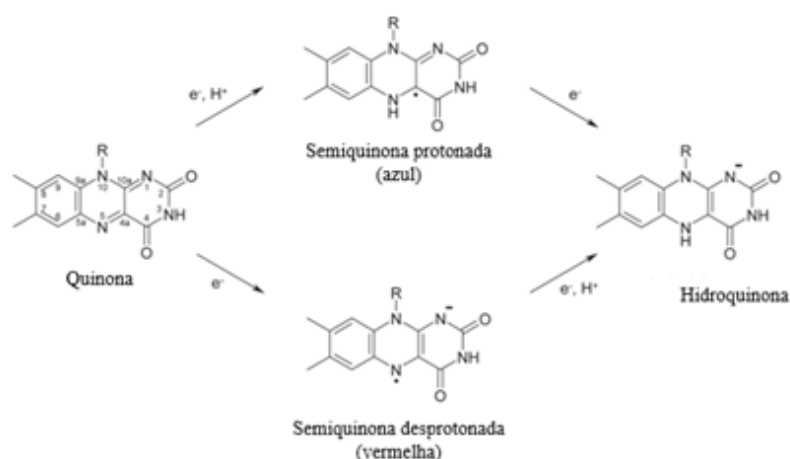


Figure 34 – Estados redox do cofator flavina ^[44]

Estes dois radicais têm característica de absorção distintos, sendo que a semiquinona azul apresenta uma banda de absorção entre 580 e 620nm, enquanto que a semiquinona vermelha tem uma forte absorção a 380 nm e a 460 nm podendo conter uma absorção adicional a 400 nm [8,34].

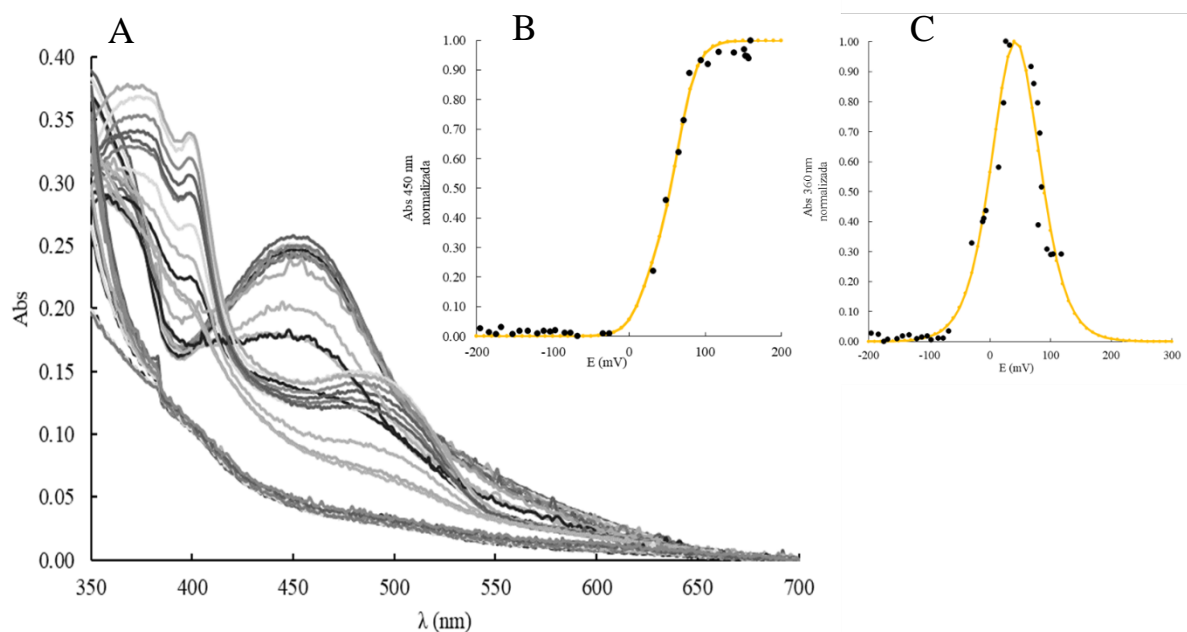


Figura 35 -A) Espectros de absorção de UV-VIS da titulação redox do enzima FDP de *Clostridium difficile* com 5 mM ditionito de sódio. B) Variação da absorvância a 450 nm C) Variação da absorvância a 360 nm

A titulação do FDP revelou um potencial de $+70\text{mV} \pm 20$ e $+30\text{mV} \pm 10$ provenientes da redução do FMN_{oxidado} para o FMN_{semi-reduzido} e do FMN_{semi-reduzido} para o FMN_{reduzido}, respectivamente - Figura 35.

Com a titulação redox, pode-se observar também que o FMN do FDP parcialmente reduzido - Figura 36 - apresenta na sua forma semi-reduzida uma semiquinona vermelha apresentando máximos de absorção a 380, 400 e 460 nm

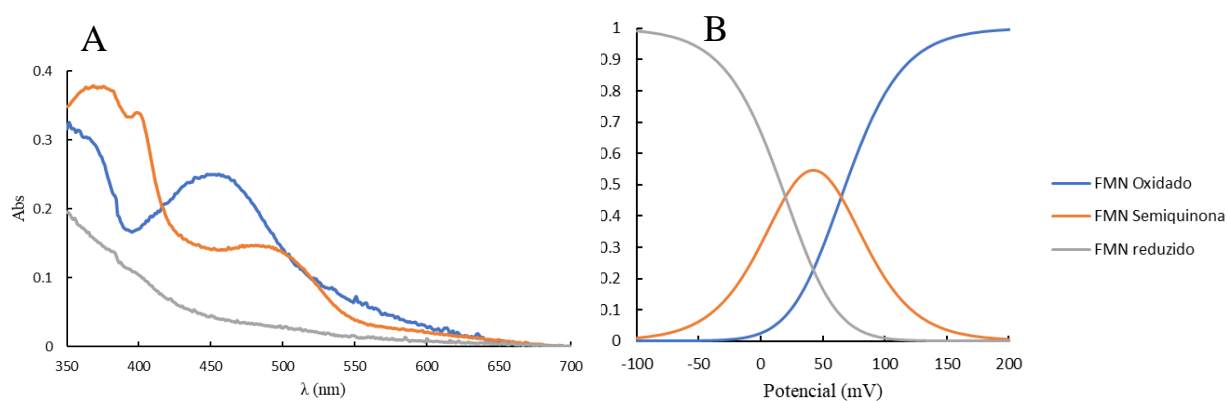


Figura 36- A) Redução gradual do enzima FDP com ditionito de sódio 5mM. FDP oxidado (linha azul), semi-reduzido (linha laranja) e reduzido (linha cinzenta). B) Curvas das diferentes populações oxidadas (linha azul) semi-reduzido (linha laranja) e reduzido (linha cinzenta) ao longo do potencial obtidas pela equação de Nernst.

3.3.1.2 – Titulação Redox do enzima HMW-Rd

Os potenciais de redução de ambos os domínios do enzima foram determinados por potenciometria, da mesma forma que o enzima anterior.

Os potenciais de redução dos dois centros são praticamente idênticos, não sendo possível discriminá-los; obteve-se um valor de 45 ± 10 mV correspondente ao domínio rubredoxina e de 35 ± 5 mV para o domínio flavodoxina, não tendo sido, possível observar a semiquinona da flavina – Figura 37.

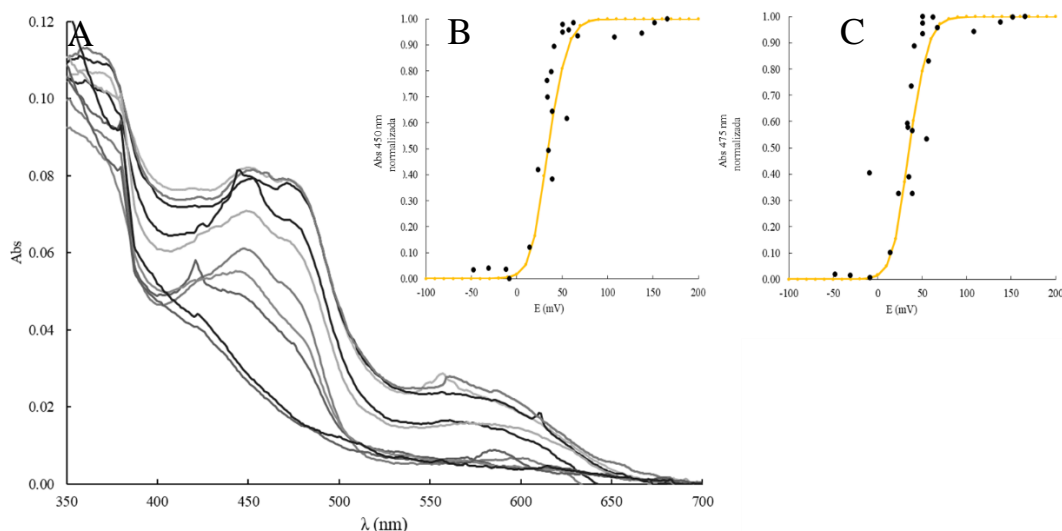


Figura 37-A) Espectros de absorção de UV-VIS da titulação redox do enzima HMW-Rd de *Clostridium difficile* com 5mM ditionito de sódio. B) Variação da absorvância a 450 nm C) Variação da absorvância a 475nm

Do mesmo modo, tentou-se reduzir o enzima com quantidades equivalente de NADH em condições anaeróbias.

Através dos espectros de absorção UV-VIS obtidos foi possível confirmar que o enzima é reduzido por NADH – Figura 38.

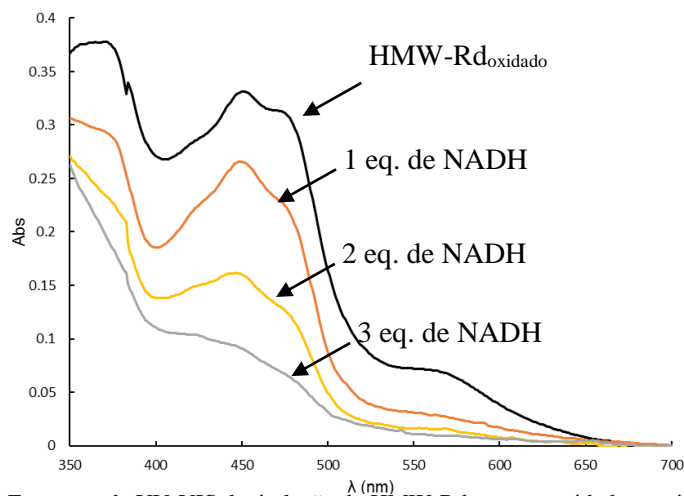


Figura 38– Espectros de UV-VIS da titulação do HMW-Rd com quantidades equivalentes de NADH em 50mM Tris HCl pH7.5, 18% glicerol

É possível também verificar que com a adição de 1 equivalente de NADH o centro rubredoxina [Fe(SCys)₄] desaparece por completo, o que parece indicar um potencial ligeiramente mais positivo para este centro que o do FMN

3.3.1.3 – Titulação Redox da Rubredoxina

O potencial da Rubredoxina foi determinado usando os máximos das bandas de absorção a 360 , 490 e 560 nm, sendo representado na figura abaixo, a redução da proteína pela titulação com ditionito de sódio - Figura 39 .

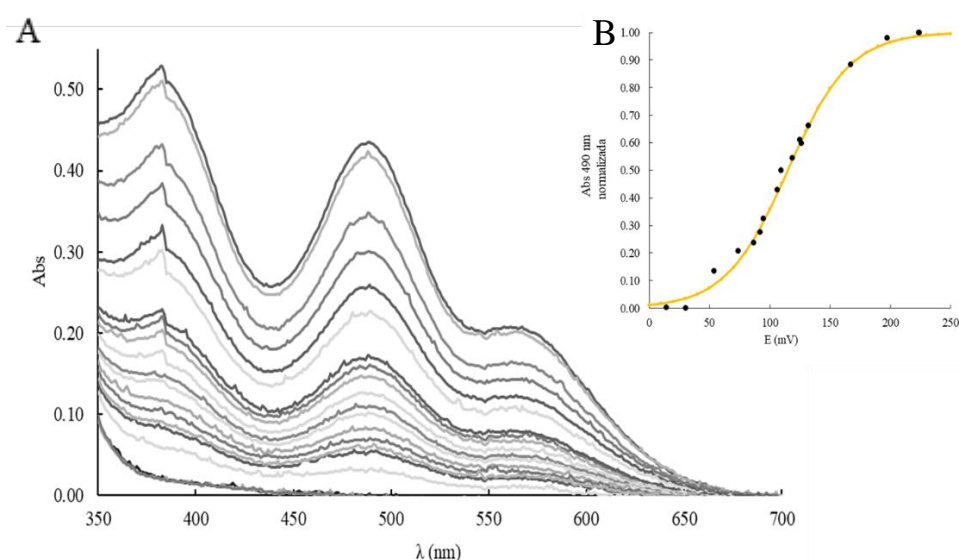


Figura 39- Titulação redox da proteína rubredoxina de *Clostridium difficile* com 5mM ditionito de sódio. B) Variação da absorvância a 490 nm ao longo do potencial a partir da equação de Nernst.

O potencial redox obtido através da equação de Nernst para esta enzima foi de $+115\text{mV} \pm 5\text{mV}$.

O potencial determinado ficou situado entre a gama de potenciais conhecidos para proteínas deste tipo, $+125\text{mV}$ para a rubredoxina de *Guilardia theta*^[45] e -140mV para o domínio Rd da FIRd de *Escherichia coli*^[28].

3.3.2 – Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica foi utilizada para caracterizar os centros férricos das diferentes proteínas.

3.3.2.1 – Espetro de RPE do enzima FDP

Foi traçado o espectro de RPE para o enzima FDP - Figura 40, sendo que na forma oxidada, só se obtém o sinal referente ao radical FMN com um valor de $g \sim 2$ estando o centro binuclear de ferro totalmente oxidado ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}}$); como os dois íons de ferro estão acoplados antiferromagneticamente, o centro não exibe espectro de RPE.

Ao se reduzir o enzima com um equivalente de menadiol o centro binuclear de ferro fica com um estado de valência mista, paramagnético ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$), obtendo-se um sinal rômbico com valores de g de 1.95, 1.91 e 1.79 característico de proteínas diférricas [28]. A observação deste sinal confirma a presença do centro diférrico.

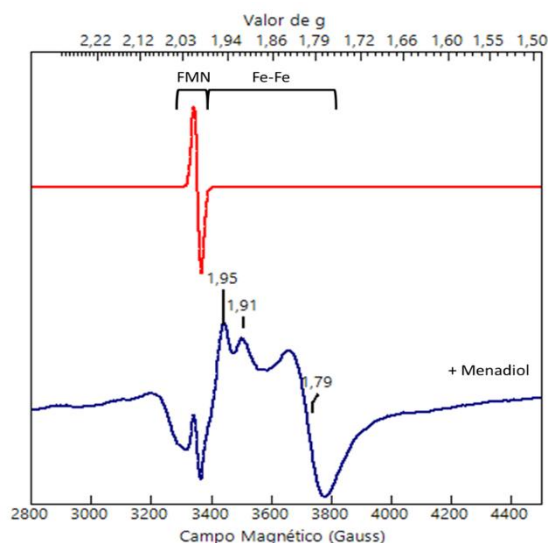


Figura 40 - Espectro de RPE do enzima FDP como isolado (linha vermelha) e no estado de valência mista (linha azul) reduzida com menadiol, em 50mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol, obtido a 7K , 2.4mW, 9,64GHz e 1mT . As setas pretas estão a indicar os valores de g do centro binuclear

3.3.2.2 – Espectro de RPE do enzima HMW-Rd e da Rd

Os espectros de RPE do HMW-Rd e da rubredoxina são característicos para estas proteínas, - Figura 41 - com o centro no estado férrico e $S=5/2$. Os valores de g para o HMW podem ser atribuídos a um sistema com $E/D \sim 0.2$, e valores de g a 8.91, (doblete fundamental, $|\pm 1/2\rangle$) e 5.00 e 3.70 (doblete do meio, $|\pm 3/2\rangle$).

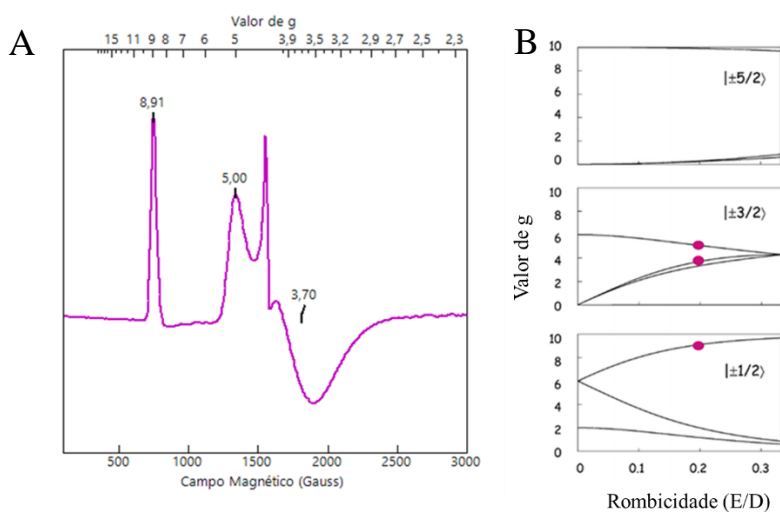


Figura 41 – A) Espectro de RPE do enzima HMW-Rd oxidado, em 50mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol, obtido a 4.6 K , 2.4 mW, 9.64 GHz e 1 mT de modulação de amplitude. As setas pretas indicam os valores de g presentes, B) Romograma com os valores de g encontrados neste sistema.

Para a rubredoxina -Figura 42 - , o espectro de RPE pode ser interpretado como resultando de um sistema com $E/D \sim 0.26$, com $g_{\max} = 9.24$ para o dobleto $|\pm 1/2\rangle$ e g a 4.72 e a 4.21 para o dobleto $|\pm 3/2\rangle$.

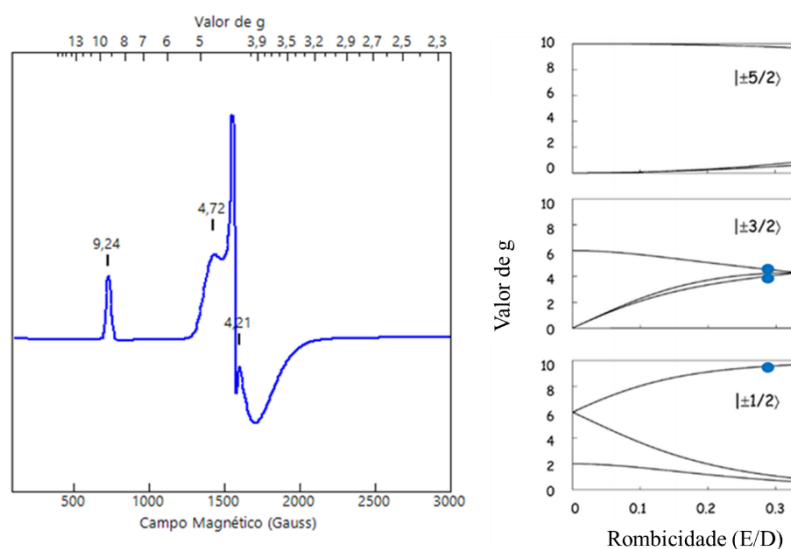


Figura 42 – A) Espectro de EPR da proteína rubredoxina oxidada, em Tris HCl 50mM pH 7.5, 10% glicerol, obtido a 4.6 K , 2.4 mW, 9.64GHz e 1mT de modulação de amplitude. As setas pretas estão a indicar os valores de g . B) Romograma com os valores de g encontrados neste sistema.

3.4 – Ensaios Cinéticos

3.4.1 – Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd

Na tentativa de se tentar analisar a possível transferência eletrônica entre as três proteínas, começou-se por verificar qual o melhor dador de elétrons ao HMW-Rd, para isso utilizou-se NADH e NADPH como dador inicial de elétrons.

Desse modo, determinou-se a atividade NAD(P)H oxidoreductase do HMW-Rd por conjunto de ensaios variando tanto o dador de elétrons (NADH ou NADPH) como o aceitador dos mesmos (DCPIP ou Rd de *C. difficile*).

Como ensaio preliminar testou-se variações de concentração tanto de NADH como de NADPH funcionando como dador de elétrons, utilizando como aceitador final de elétrons DCPIP, um aceitador de elétrons comum para NAD(P)H oxidoreductases. – Figura 43.

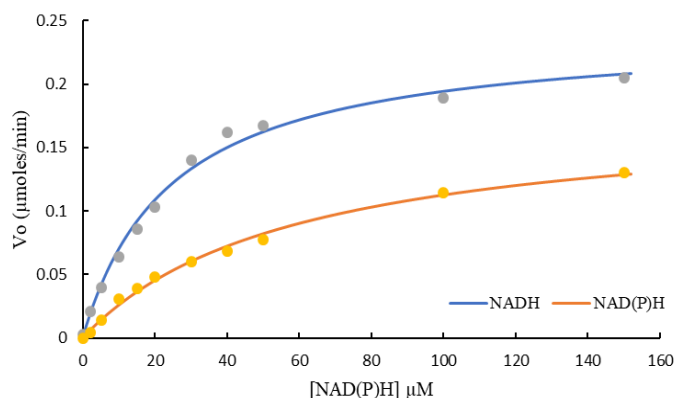


Figura 43 – Atividade NAD(P) Oxidoreductase do HMW-Rd determinada com concentrações crescentes de NADH (pontos cinzentos) ou NADPH (pontos amarelos) como dadores de eletrões e DCPIP como aceitador de eletrões seguido a comprimento de onda de 620 nm

Os ensaios seguiram uma cinética Michaeliana tendo sido possível determinar os valores da constante de Michaelis (K_M), medida inversa da afinidade do enzima para o substrato e o valor da velocidade máxima da reação (V_{max}).

Tabela 3 – Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd, determinação de V_{max} e K_M tendo NAD(P)H como dador de eletrões e DCPIP como aceitador de eletrões.

<i>Enzima</i>	<i>Substrato</i>	<i>V_{max}</i> (μmoles/min.mg)	<i>K_M</i> (μM)
<i>HMW-Rd</i>	DCPIP ^a	35	49
	DCPIP ^b	27	127
^a NADH usado como dador de eletrões			
^b NADPH usado como dador de eletrões			

De acordo com os resultados obtidos -Tabela 3- pode-se presumir que em termos de dador de eletrões o NADH demonstrou um K_M muito inferior comparativamente ao dador de eletrões NADPH, indicando que existe uma afinidade preferencial para o dador de eletrões NADH.

De seguida verificou-se qual seria o comportamento do enzima face a concentrações crescentes de aceitador de eletrões, DCPIP, com quantidades constantes de dador de eletrões, NAD(P)H – Figura 44.

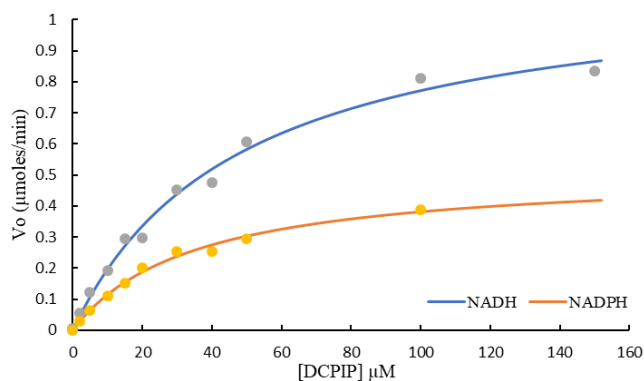


Figura 44 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd determinada com concentrações crescentes de DCPIP tendo como NADH (pontos cinzentos) ou NADPH (pontos amarelos) seguido a comprimento de onda de 340 nm

Os ensaios seguiram também uma cinética Michaeliana, em que indicaram – Tabela 4 – que com a mesma quantidade de dador de eletrões o enzima tem a mesma afinidade semelhante para doar os electrões, porém ao se utilizar NADH para dar início à reação a velocidade é mais rápida cerca 2 vezes do que se utilizar NADPH como dador de eletrões.

Tabela 4 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd, determinação de V_{max} e K_M NAD(P)H como dador de eletrões e concentrações crescentes de DCPIP como aceitador de eletrões

<i>Enzima</i>	<i>Substrato</i>	<i>V_{max}</i> ($\mu\text{moles/min.mg}$)	<i>K_M</i> (μM)
<i>HMW-Rd</i>	NADH ^c	165	48
	NADPH ^c	74	35

^cDCPIP usado como aceitador de eletrões

Com a mesma metodologia, tentou-se verificar o comportamento do possível aceitador do mecanismo proposto, a rubredoxina, com quantidades constantes de dadores de eletrões, NAD(P)H, estando as curvas ilustradas na figura 45.

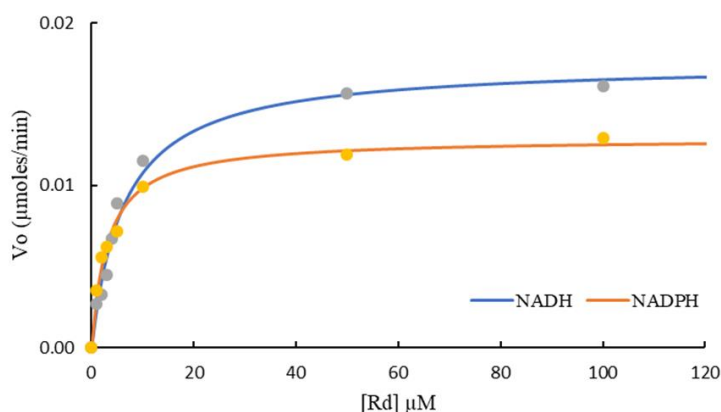


Figura 45 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd determinada com concentrações crescentes de Rubredoxina tendo como NADH (pontos cinzentos) ou NADPH (pontos amarelos) seguido a comprimento de onda de 340 nm

Tabela 5 - Atividade NAD(P)H Oxidoreductase do HMW-Rd, determinação de V_{max} e K_M NAD(P)H como dador de eletrões e concentrações crescentes de Rd como aceitador de eletrões

<i>Enzima</i>	<i>Substrato</i>	<i>V_{max}</i> ($\mu\text{moles/min.mg}$)	<i>K_M</i> (μM)
<i>HMW-Rd</i>	NADH ^c	2.53	6
	NADPH ^c	1.88	2

^cRd usado como aceitador de eletrões

Os ensaios seguiram novamente uma cinética Michaeliana, indicando – Tabela 5 – que o enzima apresenta uma afinidade muito superior para o aceitador de eletrões Rd comparativamente ao DCPIP. Foi também possível verifica que embora o sistema apresente mais afinidade com o NADPH sendo o dador de eletrões, é mais rápido quando se utiliza NADH como iniciador da reação.

Em suma, com este conjunto de ensaios conseguiu-se começar a construir o possível mecanismo de transferência eletrônica entre as três proteínas, sabendo que tanto o NADH como o NADPH são eficientes na redução do HMW-Rd e posterior redução da Rd.

Nos ensaios seguintes foi utilizado o NADH como dador de eletrões, devido a tornar a reação mais rápida.

3.4.2 – Transferência eletrônica entre as proteínas

Seguindo o caminho do tópico anterior, tentou-se verificar a possível transferência entre as proteínas, de modo a se compreender se existiria a passagem de eletrões entre HMW-Rd para a Rd e posteriormente para a FDP.

Nos ensaios anteriores verificou-se a capacidade do HMW-Rd transferir eletrões para a Rd, agora o objetivo era compreender se a Rd seria capaz de transferir os eletrões para a FDP ou se a própria HMW-Rd seria capaz de reduzir a FDP sem necessitar da ajuda da rubredoxina.

Por ultimo também se tentou verificar se após a possível redução da FDP, esta, seria capaz de se oxidar na presença de NO e/ou O₂ e voltar a reduzir-se.

3.4.2.1 – Transferência eletrônica do HMW-Rd para Rd de diferentes organismos

De modo a verificar a eficiência de redução da HMW-Rd para com a rubredoxina de *C.difficile* foi realizado um ensaio em que a HMW-Rd teve como aceitador de eletrões varias rubredoxinas de organismos diferentes.

A diferença entre elas foi analisada através de um alinhamento de sequências de aminoácidos de rubredoxinas, ilustrado na figura 46, estando organizadas de ordem decrescente do potencial de redução de cada uma – Tabela 6.

De acordo com o alinhamento múltiplo podemos verificar que as sequencias são muito conservadas entre elas apresentando os segmentos Cys-XX-Cys-Gly-(X)_n-Cys-XX-Cys-Gly altamente conservados

Ao colocar as sequências por ordem decrescente do potencial de redução pode-se verificar que à medida que o potencial desce para valores negativos - Tabela 6 -, ocorre a substituição de um resíduo de alanina por um resíduo de valina - Figura 47. Porém quando os potenciais apresentam valores quer muito positivos, quer muito negativos ocorre também substituição desse resíduo que no caso da rubredoxina de *Guillardia theta*, existe a substituição de uma alanina por uma serina e no caso do domínio rubredoxina da FIRd de *E.coli* existe a substituição de uma valina por uma leucina.

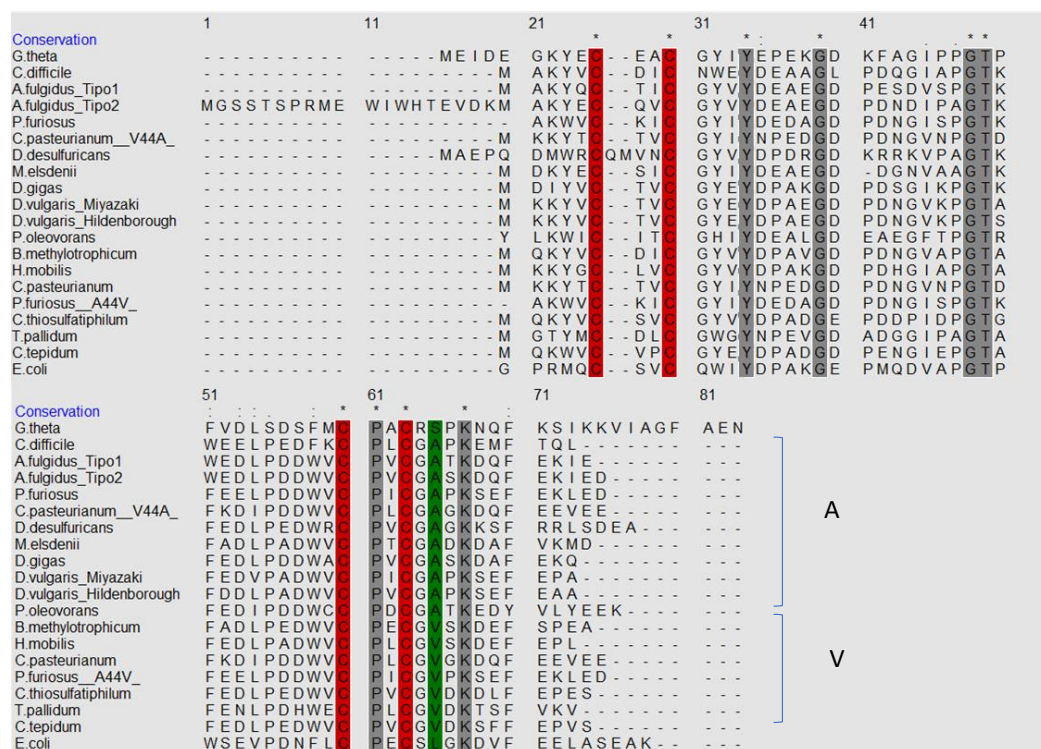


Figure 46 - Alinhamento da sequência de aminoácidos baseado na sobreposição das estruturas das rubredoxinas. A rubredoxina de *Clostridium difficile* foi alinhada com sequência de aminoácidos da rubredoxina de *G. theta*^[45], *A. fulgidus Tipo 1*^[48], *A. fulgidus Tipo 2*^[48], *P. furiosus*^[19,49,50], *D. desulfuricans*^[19,51], *M. elsdenii*^[19], *D. gigas*^[19], *D. vulgaris Miyazaki*^[19], *D. vulgaris Hildenborough*^[19], *P. oleovorans*, *B. methylotrophicum*^[19], *H. mobilis*^[19], *C. pasteurianum*^[19,49,50], *C. thiosulfatophilum*^[19], *T. pallidum*^[52], *C. tepidum*^[53] e domínio rubredoxina da FLRD de *E. coli*^[28]. Estando representado a vermelho as cisteínas que participam na ligação do ferro, a cinzento as regiões conservadas e a verde os aminoácidos que se pensa fazer a distinção do potencial de redução da proteína.

Tabela 6 - Comparação dos potenciais de redução de rubredoxinas de diferentes organismos.

Rubredoxinas de diferentes organismos	E (mV)	Rubredoxina de diferentes organismos	E (mV)
<i>Guilardia theta</i>	+125 mV	<i>Desulfovibrio vulgaris Hildenborough</i>	0mV
<i>Clostridium difficile</i>	+115mV	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	-37mV
<i>Arqueoglobus fulgidus tipo 1</i>	+75mV	<i>Butyrubacterium methylotrophicum</i>	-40mV
<i>Arqueoglobus fulgidus tipo 2</i>	+40mV	<i>Helibacillus mobilis</i>	-46mV
<i>Pyrococcus furiosus</i>	+37mV	<i>Clostridium pasteurianum</i>	-55mV
<i>Clostridium pasteurianum (V44A)</i>	+31mV	<i>Pyrococcus furiosus</i>	-58mV
<i>Desulfovibrio desulfuricans Rd_2</i>	+25mV	<i>Chlorobaculum thiosulfatophilum</i>	-61mV
<i>Megasphaera elsdenii</i>	+23mV	<i>Treponema pallidum</i>	-76mV
<i>Desulfovibrio gigas</i>	+6mV	<i>Chlorobium tepidum</i>	-87mV
<i>Desulfovibrio vulgaris Miyazaki</i>	+5mV	<i>Escherichia coli</i>	-140mV

A rubredoxina de *C. difficile* parece estar no limiar da troca de posição do resíduo de alanina, devido ao fato de apresentar um potencial muito positivo (E=+115mV) e apresenta uma asparagina no 10º resíduo enquanto que todas as outras (com exceção do domínio Rd da FLRD de *E. coli*) apresentam uma glicina.

Foi realizado um conjunto de ensaios experimentais em condições anaeróbias com algumas rubredoxinas disponíveis no laboratório de Metaloproteínas e Bioenergética do ITQB, de modo a testar a transferência eletrônica tendo como dador inicial de elétrons NADH representado Figura 47.

Foram utilizadas para além da rubredoxina de *C. difficile*, três outras proteínas com potenciais positivos e uma outra com potencial negativo.

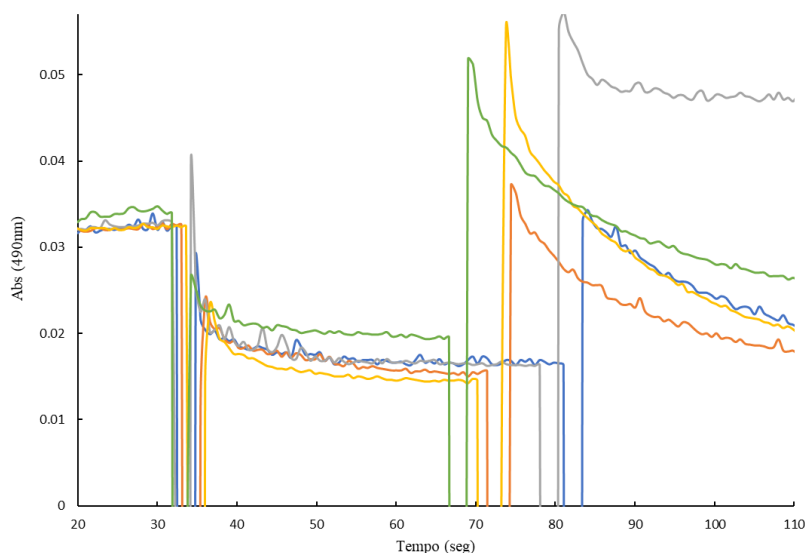


Figura 47- Ensaio cinético da transferência eletrônica entre o enzima HMW-Rd e rubredoxina de *Pyrococcus furiosus* (linha amarela), rubredoxina 1 de *Arqueoglobus fulgidus* (linha azul), rubredoxina 2 de *Arqueoglobus fulgidus* (linha laranja), domínio rubredoxina da FIRd de *E. coli* (linha cinzenta) e Rubredoxina de *Clostridium difficile* (linha verde) na presença de 5mM NADH em Tris HCl 50mM pH 7.5 18% glicerol.

Com este ensaio foi possível demonstrar que o enzima HMW-Rd não é capaz de reduzir todo o tipo de rubredoxinas, funcionando melhor quando o seu aceitador de elétrons apresenta potenciais de redução positivos.

Deste modo pode-se concluir que apesar da rubredoxina de *C. difficile* ser reduzida pelo HMW-Rd, com potenciais de redução mais baixos como o caso das rubredoxinas de *Arqueoglobus fulgidus* e *Pyrococcus furiosus* a transferência eletrônica é mais rápida, sendo a transferência interrompida se o potencial de redução for muito negativo como é o caso do domínio rubredoxina da FIRd de *E.coli*.

3.4.2.2 – Transferência eletrônica entre HMW-Rd e FDP

Como na constituição do enzima HMW-Rd existe um domínio Rd, existiria a possibilidade de somente o enzima HMW-Rd ser suficiente para reduzir a FDP e consequentemente este reduzir o seu substrato.

De modo a averiguar essa possibilidade, realizou-se um ensaio no qual o HMW-Rd foi reduzido com 1 mM NADH em condições anaeróbicas e em seguida adicionou-se o enzima FDP- Figura 48.

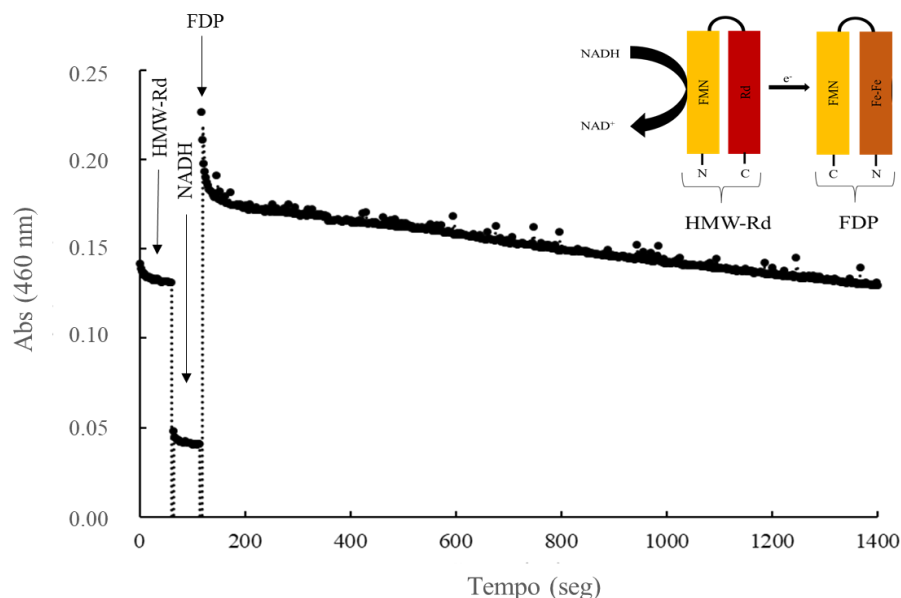


Figure 48- Redução de 20 μ M de FDP, usando como sistema de transferência eletrônica 20 μ M de HMW-Rd com 1mM de NADH, seguido a um comprimento de onda de 460 nm

Embora aparente haver redução do FDP através da transferência eletrônica por parte do enzima HMW-Rd, a redução é muito demorada, não apontando ser o mecanismo principal para a redução do FDP.

3.4.2.3 – Transferência eletrônica entre as três proteínas (HMW-Rd, Rd e FDP)

Excluído o mecanismo mais simples, para redução do FDP, no qual o HMW-Rd reduziria o FDP, tentou-se testar a hipótese proposta no objetivo deste trabalho.

Para tal, realizou-se um ensaio em que as três proteínas foram adicionadas em 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 18% glicerol na presença de 5mM de NADH em condições anaeróbicas, pela seguinte ordem: foi adicionado primeiramente o HMW-Rd, que foi reduzido pelo NADH presente na solução, seguindo-se a adição da Rd de *C. difficile* que foi reduzida pelo enzima e no final foi adicionado FDP que foi reduzido graças à transferência eletrônica efetuado pela rubredoxina como indicado na figura 49.

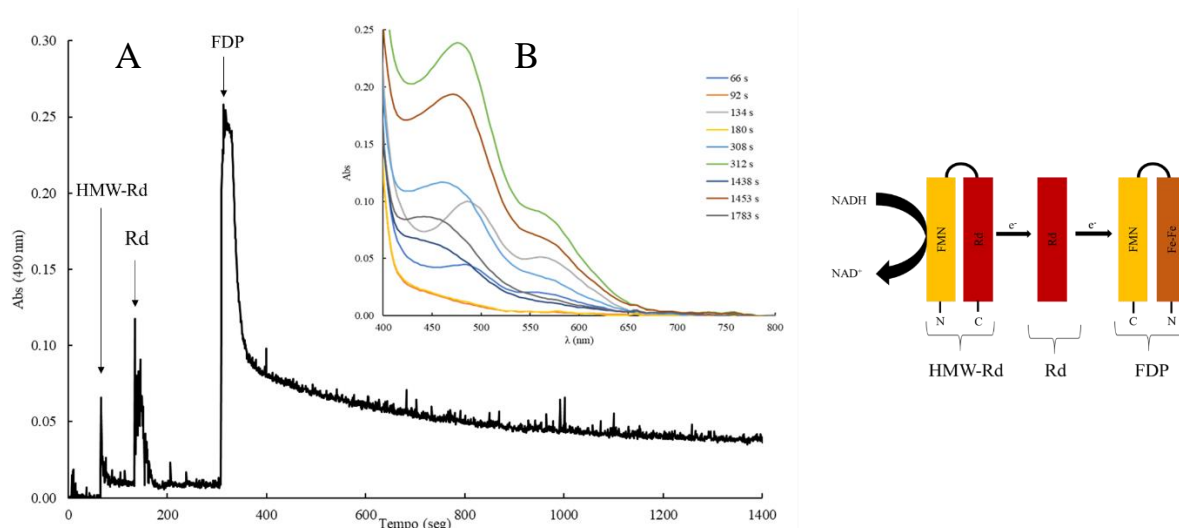


Figura 49 – Redução de 20 μ M de FDP, pelo sistema de transferência eletrônica de 20 μ M de HMW-Rd, 20 μ M Rd, 5mM NADH em condições anaeróbicas. A) Cinética obtida a um comprimento de onda de 490 nm da redução do FDP em que as setas indicam o momento da adição de cada uma das proteínas B) Espectros de absorção de UV-Visível ao longo do tempo que decorreu o sistemas de redução do FDP.

Desta forma pode-se concluir que o par HMW-Rd/Rd é capaz de reduzir a FDP., havendo deste modo a possibilidade da FDP conseguir reduzir NO e/ou O₂.

3.4.2.4 Oxidação das proteínas com o NO e Oxigénio

Utilizando o mesmo sistema de transferência eletrônica que envolve as três proteínas foi testado o modo de oxidação com NO e com o oxigénio. Depois de reduzidas foram expostas a 10 μ M de Oxigénio ou de NO, de modo a observar se as mesmas eram oxidadas com cada um dos substratos – Figura 50.

Como se pode verificar na figura abaixo, as proteínas ao adicionar cada um dos substratos oxidaram tanto com NO como com O₂. Observando-se ainda que a velocidade de redução das proteínas é mais lenta ao se utilizar uma concentração 4 vezes inferior de HMW-Rd.

Foi possível também extrair do ensaio que após a oxidação das proteínas existe novamente a redução das mesmas, apontando para uma possível conversão dos substratos.

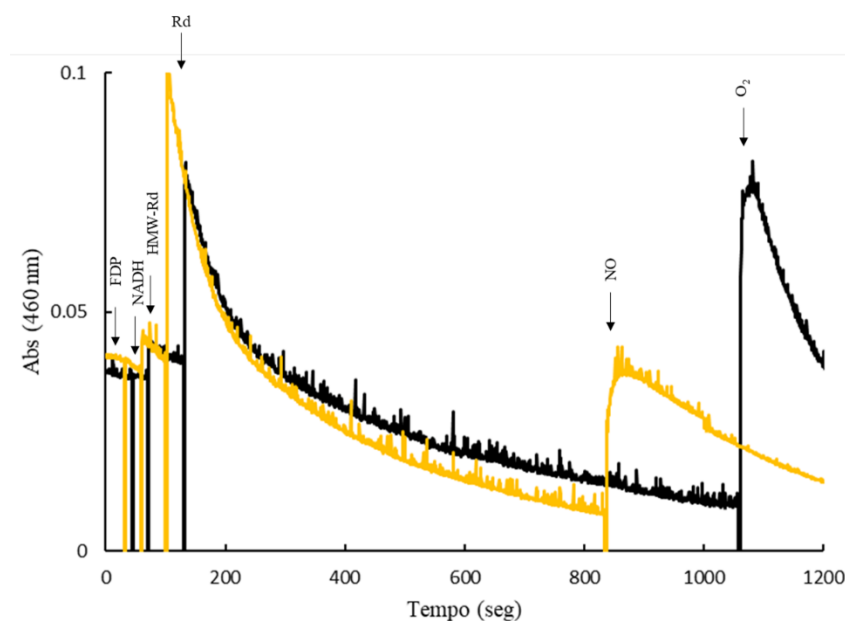


Figure 50 – Redução de 20 μM de FDP, utilizando 5 μM HMW-Rd, 20 μM Rd, 1mM NADH em condições anaeróbicas seguido de oxidação com 10 μM de Oxigênio (linha preta) ou com NO (linha amarela)

Em resumo este conjunto de ensaios permitiu comprovar a existência de transferência eletrônica entre as três proteínas, bem como a possibilidade de conversão dos substratos NO e O_2 .

Propondo deste modo, um mecanismo possível da transferência eletrônica entre as proteínas tendo como dador de elétrons inicial NADH demonstrado na figura 51, no qual o NADH cede elétrons ao HMW-Rd, este reduz a rubredoxina e no final o FDP é reduzido graças a transferência eletrônica entre ele e a rubredoxina.

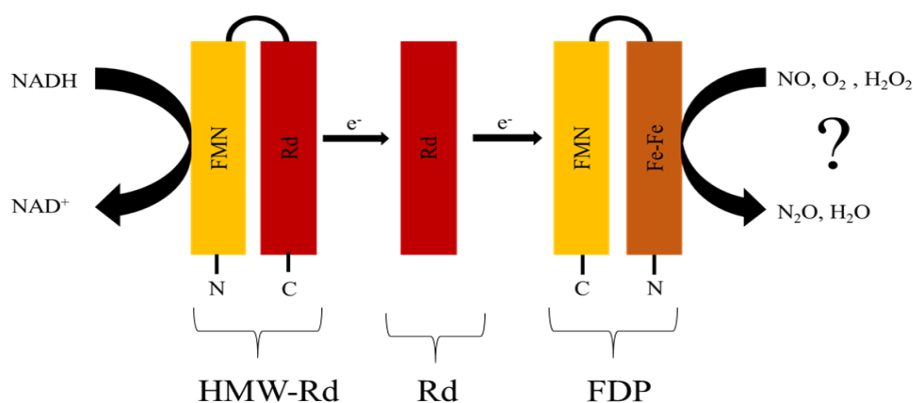


Figura 51- Mecanismo de transferência eletrônica entre o HMW-Rd, Rd e FDP

Uma vez o enzima FDP reduzido, considera-se que este será o enzima responsável pela conversão do NO e O_2 em espécies não nocivas para o organismo.

3.5 Ensaios Amperométricos

Após se ter concluído que as proteínas reagem à presença tanto do oxigénio como do óxido nítrico, teve-se como próximo objetivo averiguar se mecanismo proposto anteriormente é capaz de converter ambos os substratos sendo um possível mecanismo para a destoxificação do organismo destes compostos.

Foi descrito que ao nível do centro catalítico os vários enzimas da família das FDP's são bastante semelhantes, sendo os ligantes estritamente conservados, com o ferro ligado aos resíduos de histidinas e aspartatos/glutamatos^[31]. Porém apresentam algumas diferenças na estrutura que pensa-se poder dar indicação do tipo de seletividade das FDPs para os diferentes substratos (NO e/ou O₂).^[31]

Para tentar compreender o tipo de substrato preferencial do FDP de *C. difficile* foi realizado um alinhamento múltiplo em que o FDP em estudo foi alinhado com FDP de *G.intestinalis* (PDB=2Q9U), de *T.maritima* (PDB=1VMEA), *M.marburgensis* (PDB=2OHI) que são seletivos para oxigénio, *E.coli* FDP-D (PDB=4D02) descrito como sendo seletivo para o NO e ainda *M.thermoacetica* (PDB=1YCFC) e de *D.gigas* (PDB=1E5DA) que não são seletivos para nenhum dos substratos – Figura 52 ^[31].

Sabendo a priori que os resíduos lisina (*G.intestinalis* Lys⁵⁸) e o tirosina (*G.intestinalis* Tyr²⁶⁷) são indicativos que o enzima é seletivo para o oxigénio e que os resíduos aspartato (*E.coli* Asp⁵²) e o resíduo serina (*E.coli* Ser²⁶²) são específicos de enzimas seletivas para o NO.

	1	11	21	31	41
Conservation					
<i>G.intestinalis</i>	---	---	VQDQEMIPGV	YWVGIVDMWV	RIFHG--YHT
<i>T.maritima</i>	MGSDKIH HHH	HHMPKIWTER	IFDD--PEI	YVLRIDDDR	RYFEA-VWEI
<i>M.marburgensis</i>	---	---MKAAAKR	ISD---GV	YWTGVLDWDL	RNYHG--YT
<i>E.coli</i>	---	---MSIV---	VKN---NI	HWVGQRDWEV	RDFHGT EYKT
<i>M.thermoacetica</i>	---	---SQPVA---	ITD---GI	YWVGAVDWN	RYFHGPAFST
<i>D.gigas</i>	---	---MQATK---	IID---GF	HLVGAIDWNS	RDFHG-YTLS
<i>C.difficile</i>	---	---MKQA IQ---	MKE---NM	YWVGVDHFN	RHFHGD LFP
	51	61	71	81	91
Conservation					
<i>G.intestinalis</i>	DEGSSYNSYF	ID-DECPTVI	DSVYYPFAEE	WLSRIAAC--	-CPLDKIKYV
<i>T.maritima</i>	PEGISYNAYL	VKLNGANVLI	DGWKGN YAKE	FIDALSKI--	-VDPKEITHI
<i>M.marburgensis</i>	LQGT TYNAYL	VCGDEGVALI	DNSYPGTFDE	LMARVEDALQ	QVGMERVDYI
<i>E.coli</i>	LRGSSYNSYL	IR-EEKNVLI	DTVYHKFSRE	FVQNL RNE--	-IDLADIDYI
<i>M.thermoacetica</i>	HRGTTYNAYL	IV-DDKTALV	DTVYEPFKEE	LI AKLKQI--	-KDPVKLDYL
<i>D.gigas</i>	PMGTTYNAYL	VE-DEKTLTF	DTVKA EYKGE	LLCGIASV--	-IDPKKIDYL
<i>C.difficile</i>	AEGTTYNAYL	IV-DEQVTLI	DTVVEEFYDT	MMERIRSV--	-IGERTIDNV
	101	111	121	131	141
Conservation					
<i>G.intestinalis</i>	VMNAGGGA	SSLKDHYHKF	-TNATFVCTK	KCQEHLKILY	-GMEKATWLI
<i>T.maritima</i>	IVNHTEPDHS	GSLPATL KTI	GHDVEIIASN	FGKRLLEGFY	-GIKD--VTV
<i>M.marburgensis</i>	IQNVEKDH S	GVLVELHRRF	-PEAPIYCTE	VAVKGLLKH Y	PSLREAEFMT
<i>E.coli</i>	VINAEEDHA	GALTELMAQI	-PDTP IYCTA	NAIDSLNGHH	-HHP EWNFN
<i>M.thermoacetica</i>	VVNHTESDHA	GAFPAIMELC	-PD AHVLC TQ	RAFD SLKAHY	-SHIDFN YTI
<i>D.gigas</i>	VIQPLELDHA	GALPALIEAC	-QPEKIFTSS	LGQKAMESHF	-HYKDWPVQV
<i>C.difficile</i>	IVQHAEPDHS	GGFLKFMKDY	-PNARPYASN	AGVGIMLKQY	-FKSYDFQR
	151	161	171	181	191
Conservation					
<i>G.intestinalis</i>	VDDKYTLKI	-KRTLKFI PV	PLLWPDSTF	TYCPEDKILF	SNVGFQGHYA
<i>T.maritima</i>	VKDGEEREIG	-GKKFKFVMT	PWLWPD TMV	TYL--DGILF	SCV--GGGYL
<i>M.marburgensis</i>	VKTGDVLDLG	-GKTLTFLET	PLLWPD SMF	TLLDEDGILF	SNVAFGQHLC
<i>E.coli</i>	VKTGDTLDIG	NGKQLIFVET	PMLWPD SMM	TYLTGDAVLF	SNVAFGQH YC
<i>M.thermoacetica</i>	VKTGTSVSLG	-KRSLTFIEA	PMLWPD SMF	TYVPEEALLL	PNVAFGQHIA
<i>D.gigas</i>	VKHGETLSLG	-KRTVTFYET	RMLWPD SMV	SWFADEKVL I	SNVIFGQNI A
<i>C.difficile</i>	VKTGDTLSTG	-RYTLTFEVM	PMIWP DNML	TYVAEQKIAF	SNVAFGQHIA

	201	211	221	231	241
Conservation					
G.intestinalis	T S R R W A D E C D	- - V S H V M H L F	K E Y T A N I L G L	F S A Q M R K A L E	V A S T V - - - E
T.maritima	L P E I L D D S N E	S V V E R Y L P H V	T K Y I V T V I G H	Y K N Y I L E G A E	K L S S L - - - K
M.marburgensis	C P Q R L D R E I P	- - E Y I L M D A A	R K F Y A N L I T P	L S K L V L K K F D	E V K E L G L L E R
E.coli	D E H L F N D E V D	- - Q T E L F E Q C	Q R Y Y A N I L T P	F S R L V T P K I T	E I L G F N L - - P
M.thermoacetica	T S V R F D D Q V D	- - A G L I M D E A	A K Y Y A N I L M P	F S N L I T K K L D	E I Q K I N L - - A
D.gigas	A S E R F S D Q I P	- - V H T L E R A M	R E Y Y A N I V N P	Y A P Q T L K A I E	T L V G A G V - - A
C.difficile	S Y D I F D D A H G	- - A A K C I D R A	K D Y Y A N I V M P	Y G M Q V A N K L K	Q I Q D M N L - - D
	251	261	271	281	291
Conservation					
G.intestinalis	I K Y I L S A * G V	S W R G - D A M G L	A I A E Y D R W S K	G Q H C Q K K V T V	V L D S M * G T T H
T.maritima	I K A L L P G * G L	I W K K - D P Q R L	- L N H Y V S V A K	G D P K K G K V T V	I Y D S M Y G F V E
M.marburgensis	I Q M I A P S * G Q	I W T - - D P M K I	- I E A Y T G W A T	G M V - D E R V T V	I Y D T M * G S T R
E.coli	V D M I A T S * G V	V W R D - N P T Q I	- V E L Y L K W A A	D Y Q - E D R I T I	F Y D T M S N N T R
M.thermoacetica	I K T I A P S * G I	I W R K - D P G R I	- I E A Y A R W A E	G Q G - K A K A V I	A Y D T M * L S T E
D.gigas	T S V R F D D Q V D	I F R G A D Q C T F	A V Q K Y V E Y A E	Q K P - T N K V V I	F Y D S M * H S T E
C.difficile	I D M I A P A * G I	I W R S - Y L P E L	- F Q A Y E D F A T	F K A - V D K A V I	V Y E S V * K H T Q
	301	311	321	331	341
Conservation					
G.intestinalis	R M A L A L L D G A	R S T G - - C E T V	L L E M T S S D I -	- - T K V A L H T Y	D S G A V A F A S P
T.maritima	N V M K K A I D S L	K E K G - - F T P V	V Y K F S D E E R P	A I S E I L K D I P	D S E A L I F G V S
M.marburgensis	K M A H A I A E G A	M S E G - - V D V R	V Y C L H E D D R -	- - S E I V K D I L	E S G A I A L G A P
E.coli	M M A D A I A Q G I	A E T D P R V A V K	I F N V A R S D K -	- - N E I L T N V F	R S K G V L V G T S
M.thermoacetica	K M A H A L M D G L	V A G G - - C E V K	L F K L S V S D R -	- - N D V I K E I L	D A R A V L V G S P
D.gigas	K M A R V L A E S F	R D E G - - C T V K	L M W C K A C H H -	- - S Q I M S E I S	D A G A V I V G S P
C.difficile	M M A E A L A E G M	G R N G - - I C V K	I F K C S M T S P -	- - A I I Q K E L L	D A K A V L V G S G
	351	361	371	381	391
Conservation					
G.intestinalis	T L N N T M M P S V	A A A L N Y V R G L	- - T L I K G K P A	F A F G A F G W S N	R A V P D I V A E L
T.maritima	T Y E A E I H P L M	R F T L L E I I D K	- - A N Y E K P V	L V F G V H G W A P	S A E - R T A G E L
M.marburgensis	T I Y D E P Y P S V	G D L L M Y L R G L	K F N R T L T R K A	L V F G S M G G N G	G A T - G T M K E L
E.coli	T M N N V M M P K I	A G L V E E M T G L	- - R F R N K R A	S A F G S H G W S G	G A V - D R L S T R
M.thermoacetica	T I N N D I L P V V	S P L L D D L V G L	- - R P K N K V G	L A F G A Y G W G G	G A Q - K I L E E R
D.gigas	T H N M G I L P Y V	A G T L Q Y I K G L	- - R P Q N K I G	G A F G S F G W S G	E S T - K V L A E W
C.difficile	N Y N N A M A G S I	A A F L E K L I T C	- - K V K N K K G	L G F G S Y G W A N	L V T - K E I N A R
	401	411	421	431	441
Conservation					
G.intestinalis	R D G C K A D V Y D	E K G I T F K F N Y	T E E L L E Q A Y N	A G V D L G K R A I	A Y C E K N A P K Q
T.maritima	L K E T K F R I L S	F T E I K G S N M D	E R K I E E A I S L	L K K E L E - - - -	- - - - - - - - - -
M.marburgensis	L A E A G F D V A C	E - - E E V Y Y V P	T G D E L D A C F E	A G R K L A A E I R	R - - - - - - - - -
E.coli	L Q D A G F E M S L	S - - L K A K W R P	D Q D A L K L C R E	H G R E I A R Q W A	L A P L P Q S T V N
M.thermoacetica	L K A A K I E L I A	E P G P T V Q W V P	R G E D L Q R C Y E	L G R K I A A R I A	D - - - - - - - - -
D.gigas	L T G M G F D M P A	T P - V K V K N V P	T H A D Y E Q L K T	M A Q T I A R A L K	A K L A A - - - - -
C.difficile	L G K A G I T L L N	D E V V S Q N Y T P	S E A D L D A L M E	L G K Q I A E E I K	A M - - - - - - - -
	451	461	471	481	491
Conservation					
G.intestinalis	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
T.maritima	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
M.marburgensis	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
E.coli	T V V K E E T S A T	T T A D L G P R M Q	C S V C Q W I Y D P	A K G E P M Q D V A	P G T P W S E V P D
M.thermoacetica	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
D.gigas	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
C.difficile	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -
	501	511	521		
Conservation					
G.intestinalis	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -		
T.maritima	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -		
M.marburgensis	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -		
E.coli	N F L C P E C S L G	K D V F E E L A S E	A K		
M.thermoacetica	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -		
D.gigas	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -		
C.difficile	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -	- - - - - - - - - -		

Figura 52 – Alinhamento da sequência de aminoácidos baseado na sobreposição das estruturas das FDPs. A FDP de *C. difficile* foi alinhada com sequência de aminoácidos das FDPs de *G.intestinalis* (PDB=2Q9U), de *T.maritima* (PDB=1VMEA), *M.marburgensis* (PDB=2OHI) que são seletivos para oxigênio, *E.coli* FDP-D (PDB=4D02) descrito como sendo seletivo para o NO e ainda *M.thermoacetica* (PDB=1YFCF) e de *D.gigas* (PDB=1E5DA). Estão indicadas a cinzento as regiões conservadas, a vermelho os aminoácidos específicos para cada substrato e a verde ilustra o local de ligação do centro ativo diférrico não hémico

Após a análise do alinhamento e de acordo com os aminoácidos específicos, a FDP de *C. difficile* aparenta ter atividade para ambos os substratos, pois, contem outras combinações de aminoácidos nas duas posições específicas apresentando um ácido glutâmico (Glu⁵⁴) e triptofano (Trp²⁶³) na sua sequência.

3.5.1 – Seletividade para o oxigénio

O primeiro substrato utilizado para averiguar a atividade da FDP foi o oxigénio molecular. Neste ponto do trabalho foi analisado a atividade de cada um dos enzimas de modo a contabilizar a atividade individual de cada um.

3.5.1.1 – Atividade do enzima HMW-Rd para substrato O₂

Foi realizado um ensaio de consumo de oxigénio na ausência de catalase – Figura 53. A ausência de catalase permitiu verificar se a conversão do oxigénio pelo HMW-Rd produziria H₂O₂.

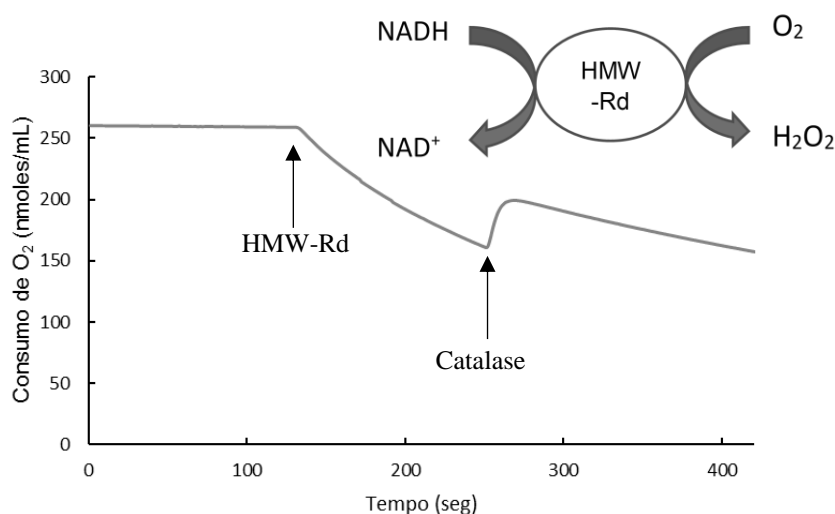


Figura 53-Atividade do HMW-Rd para o oxigénio na ausência inicial de catalase, em Tris-HCl 50mM pH 7.5, 18% de glicerol, 5mM NADH e nM SOD

O ensaio permitiu verificar que a conversão do oxigénio pelo HMW-Rd produz peróxido de hidrogénio, pois no momento em que é adicionado catalase no ensaio o peróxido formado é convertido em oxigénio verificando-se um aumento na concentração de oxigénio presente.

3.5.1.2 – Atividade dos enzimas com diferentes combinações entre elas para o substrato Oxigénio

Com o objetivo de determinar a atividade das proteínas para o oxigénio, testou-se várias combinações das mesmas, na proporção de 1:1 entre elas, tendo sido realizado 4 ensaios independentes nos quais se analisou a atividade das proteínas.

De modo a facilitar a análise dos resultados dividiu-se os ensaios em 4 designações, tendo sido atribuído a letra A no ensaio em que todas as proteínas estavam presentes, por B quando só os enzimas estavam presentes (HMW-Rd, FDP), pela letra C quando só o par rubredoxina/FDP estava presente e atribuiu-se a letra D ao ensaio em que se usou somente o enzima HMW-Rd - Figura 54.

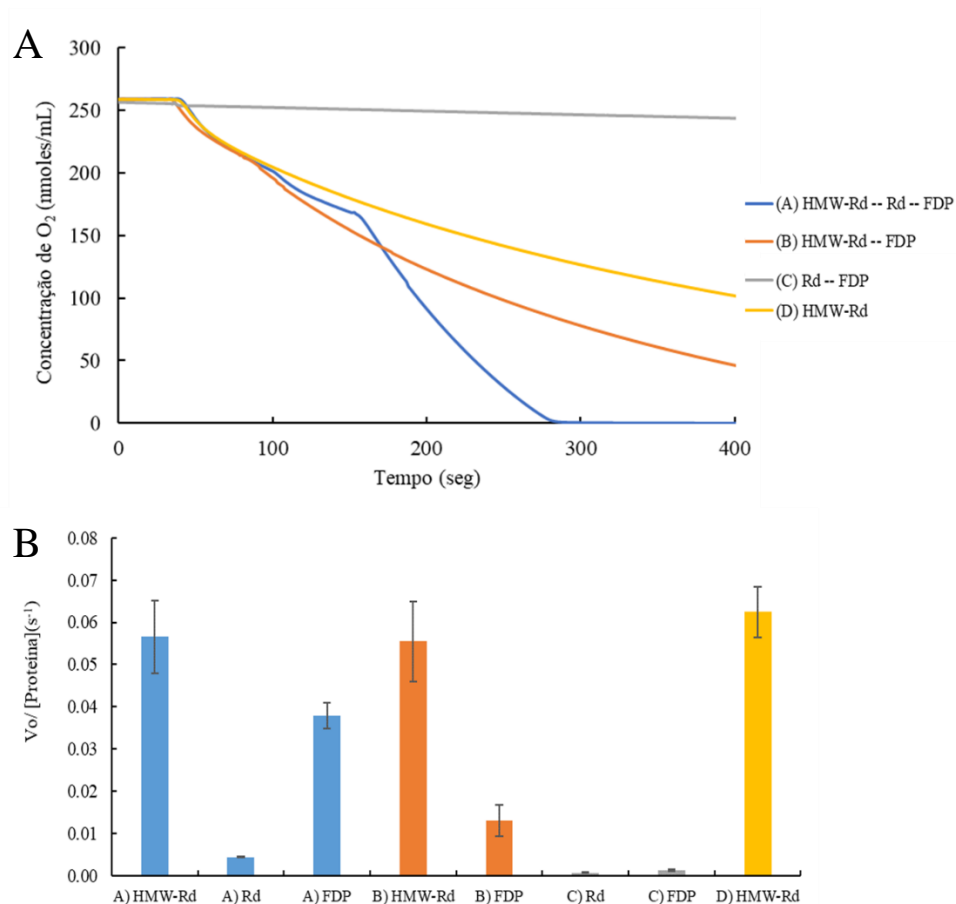


Figura 54 – A) Monitorização da atividade específica das diferentes proteínas para o oxigénio com diferentes sistemas de transferência eletrónica em 5mM NADH, 1.3 nM SOD e 7 nM Catalase em 50mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol. (A) 20 µM de HMW-Rd, 20 µM Rd e 20 µM de FDP. (B) 20 µM HMW-Rd e 20 µM FDP. (C) 20 µM Rd e 20 µM FDP. (D) 20 µM HMW-Rd. B) Quantificação das atividades das proteínas consoante o sistema de transferência eletrónica utilizado.

As atividades foram depois quantificadas para cada umas das proteínas individualmente - Tabela7.

Tabela 7 - Atividade específica das diferentes proteínas, consoante o sistema de transferência eletrónica utilizado

		HMW-Rd	Rd	FDP
Atividade <i>redutase (S-I)</i>	O ₂ A	0.057 ± 8x10 ⁻³	0.005 ± 5x10 ⁻⁵	0.038 ± 3x10 ⁻³
	B	0.056 ± 9x10 ⁻³	-----	0.013 ± 3.7x10 ⁻³
	C	-----	0.001 ± 1x10 ⁻⁴	0.001 ± 2.3x10 ⁻⁴
	D	0.062 ± 6x10 ⁻³	-----	-----

Com estes ensaios foi monitorizado o consumo de oxigénio utilizando 4 possíveis mecanismos.

Desse modo, foi possível verificar que a atividade do FDP é superior quando as três enzimas estão presentes na experiência, indicando que o mecanismo de transferência eletrónica é eficiente possibilitando a conversão do substrato em estudo.

Verificou-se igualmente que na ausência de Rd, a atividade do enzima FDP é afetada drasticamente, podendo dever-se a baixa velocidade de transferência eletrônica entre o HMW-Rd e o FDP, demonstrada na Figura 54.

Observa-se ainda que na ausência de HMW-Rd o sistema de transferência eletrônica é interrompido impossibilitando o FDP de consumir oxigênio.

Em síntese, estes ensaios permitiram concluir que para além da atividade do enzima ser determinado pelos seu parceiros de redução, o FDP só apresenta uma atividade máxima quando as três proteínas estão presentes, sendo aproximadamente igual a $0.038 \pm 3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

3.5.1.3 – Atividade redutase do oxigênio do enzima FDP

Uma vez estabelecido que o FDP apresenta uma maior atividade O_2 -redutase quando as três proteínas estão presentes no ensaio, tentou-se otimizar o mecanismo variando a concentração tanto do enzima HMW-Rd como da Rd, de modo a verificar-se se existiria a possibilidade de aumentar atividade do enzima FDP.

Num primeiro conjunto de ensaios, variou-se a concentração de HMW-Rd, mantendo as concentrações de rubredoxina e de FDP constantes, estando as atividades verificadas para o enzima FDP estão ilustradas na Figura 55.

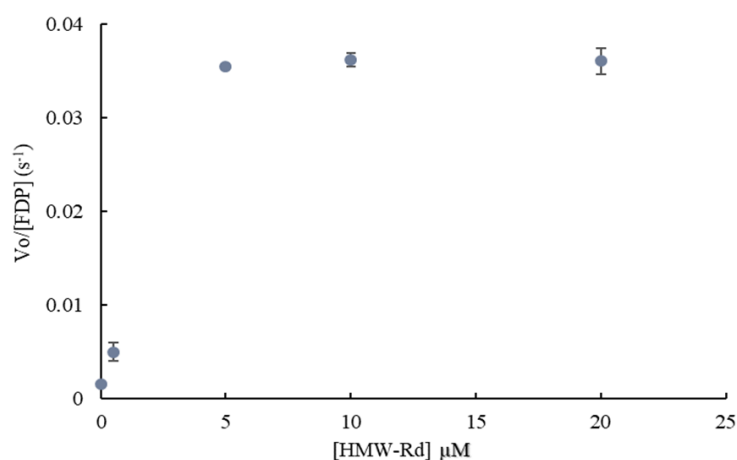


Figura 55 - Atividade específica do FDP para o oxigênio com diferentes concentrações de HMW-Rd (0-20μM), 20 μM de Rd, 5mM NADH, 1.3nM SOD e 7nM Catalase em 50 mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol

Com os resultados obtidos – Tabela 8- pode-se concluir que com concentrações acima dos 5 μM de HMW-Rd a atividade do FDP mantém-se constante.

Tabela 8 - Atividade específica do FDP com diferentes concentrações de HMW-Rd (0-20μM)

<i>[HMW-Rd] μM</i>	0	0.5	5	10	20
<i>$V_o[\text{FDP}] (\text{s}^{-1})$</i>	$0.001 \pm 2.3 \cdot 10^{-4}$	$0.006 \pm 9.7 \cdot 10^{-4}$	$0.035 \pm 6.3 \cdot 10^{-5}$	$0.037 \pm 7 \cdot 10^{-4}$	$0.038 \pm 1.4 \cdot 10^{-3}$

Em seguida realizou-se o mesmo tipo de ensaio variando-se a concentração de rubredoxina e mantendo-se os enzimas a uma concentração constante, as atividades verificadas para o enzima FDP estão demonstradas na Figura 56.

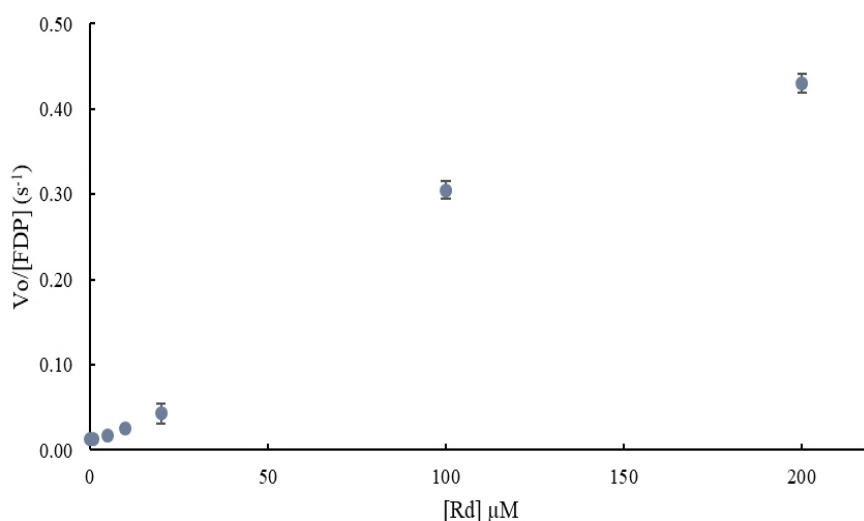


Figura 56 - Atividade específica do FDP para o oxigênio com diferentes concentrações de Rd (0-200μM), 5μM de HMW-Rd, 5mM NADH , 1.3nM SOD e 7nMCatalase em 50mM Tris HCl pH 7.5, 18% glicerol

Tabela 9 -Atividade específica do FDP com diferentes concentrações de Rd (0-200μM)

[Rd] μM	0	1	5	10	20	100	200
Vo/[FDP] (s⁻¹)	0.01 ± 4.2x10 ⁻³	0.01 ± 2.6x10 ⁻³	0.02 ± 7x10 ⁻⁴	0.03 ± 2.4x10 ⁻³	0.04 ± 1.4x10 ⁻³	0.31 ± 1x10 ⁻²	0.43 ± 1.2x10 ⁻²

É possível observar que à medida que se aumenta a concentração de rubredoxina no ensaio existe o aumento da atividade do enzima FDP, tendo-se determinado uma atividade máxima para este enzima de $0.43 \pm 1.2 \times 10^{-2}$ na conversão do oxigênio.

Assim sendo, podemos supor que a rubredoxina é o elemento-chave para a transferência eletrônica entre os dois enzimas, possibilitando desta forma a destoxificação de oxigênio no organismo por parte deste sistema.

3.5.2 – Seletividade para o NO

Com o mesmo objetivo dos ensaios anteriores, testou-se neste ponto a atividade específica dos enzimas para o NO.

3.4.2.1 – Atividade redutase do NO do enzima FDP

Seguidamente, testou-se o mecanismo proposto anteriormente para a redução do NO, tendo-se colocado o HMW-Rd e a Rd no início do ensaio (ausência de NO) e só depois das adições da solução saturada com NO foi adicionado NADH para dar início a reação, quando a reação estabilizou adicionou-se a FDP e registou-se a sua atividade - Figura 64.

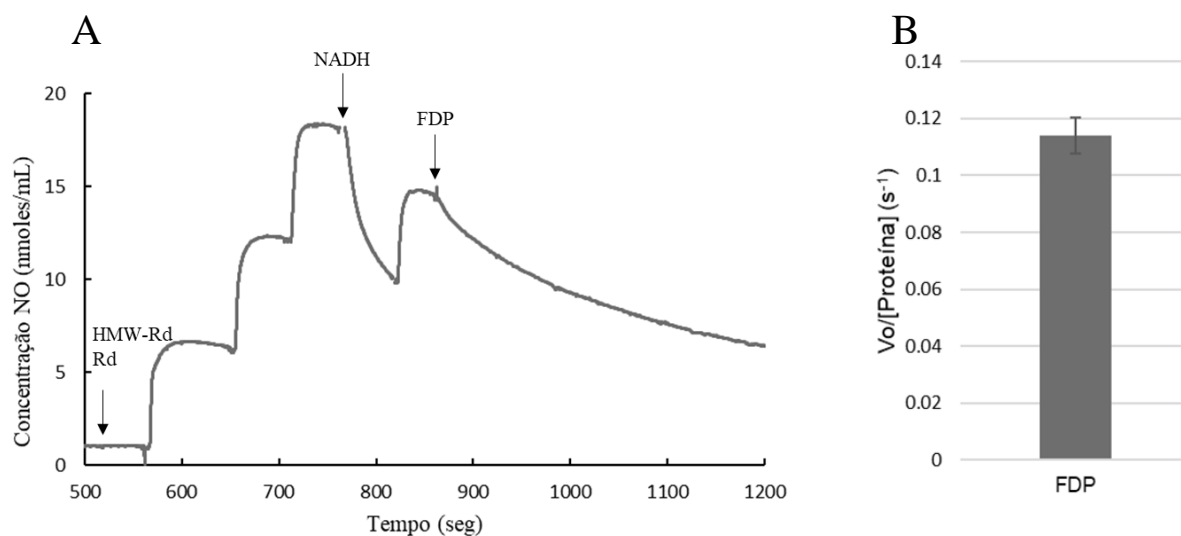


Figura 57 – A)Atividade do enzima FDP para a redução do NO, em 50mM Tris-HCl pH 7.5, 18% de glicerol, 20 μ M de rubredoxina , 5 μ M de HMW-Rd, 5 mM NADH e 14 μ M NO em condições anaeróbicas. As setas indicam o momento de adição de cada uma das substâncias. B) Quantificação da atividade específica do enzima FDP.

Tabela 10- Atividade específica do FDP para a redução do substrato NO.

Proteína	FDP
$Vo/[Proteína] (s^{-1})$	$0.114 \pm 6 \times 10^{-3}$

De acordo com as atividades obtidas – Tabela 10- pode-se observar que para o substrato NO o enzima FDP apresenta uma atividade muito baixa quando comparada com enzimas do mesmo tipo, estando na mesma ordem de grandeza da atividade manifestada para o oxigênio

Embora o enzima FDP tenha demonstrado atividade para ambos os substratos, a sua atividade rondou os $0.43 s^{-1}$ para o oxigênio e $0.114 s^{-1}$ para o NO sendo atividades muito baixas comparativamente a proteínas do mesmo tipo como é o caso da FDP de *Morella thermoacetica* que pela sequencia de aminoácidos também apresentava afinidade para os dois substratos apresenta atividades de $48 s^{-1}$ para a redução do NO e de $50 s^{-1}$ para a redução do oxigênio ^[47].

3.6 - Atividade peroxidase do enzima FDP

Depois de se ter avaliado a capacidade do enzima FDP converter tanto o oxigênio como o NO e ter-se concluído que apesar do enzima ter atividade para ambos os substratos a sua atividade é muito baixa comparativamente a enzimas que realizam a mesma atividade, tentou-se verificar se o FDP teria atividade para outro tipo de substrato.

Outra molécula que participa no stress oxidativo é o peróxido de hidrogénio, desse modo testou-se a capacidade do FDP converter peróxido de hidrogénio utilizando o sistema de transferência eletrónica proposto nos ensaios anteriores.

Na figura 58 está ilustrado, a participação do enzima FDP no metabolismo do peróxido de hidrogénio.

Com este ensaio é notório a participação da FDP no metabolismo do peróxido de hidrogénio, sendo que quando não é adicionado FDP no ensaio o consumo de NADH é mais lento.

O consumo de NADH verificado na ausência de FDP pode ser resultado da atividade O₂-redutase convertendo desse modo o oxigénio presente no momento da adição da solução de peróxido de hidrogénio.

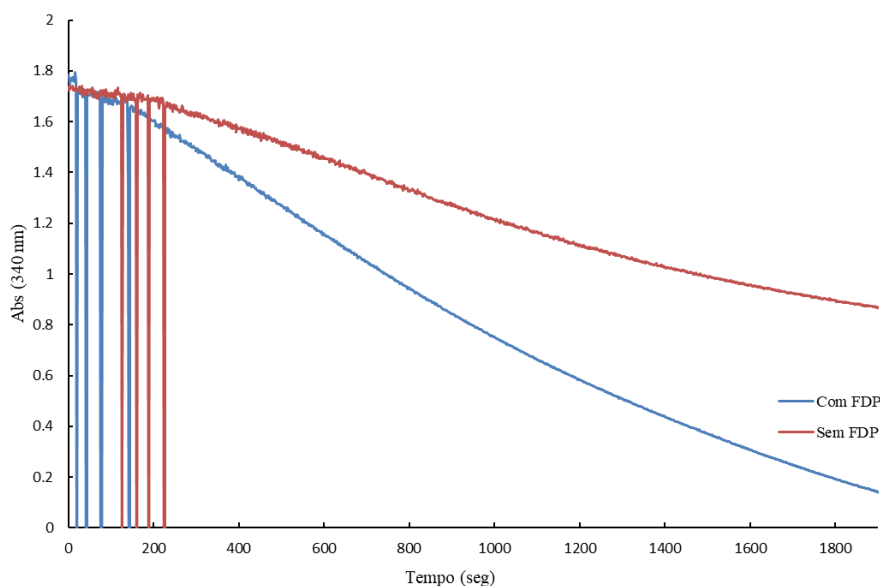


Figura 58– Monitorização do consumo de NADH exercido após a injeção de peróxido de hidrogénio na presença (linha azul) e na ausência (linha magenta) do enzima FDP.

Após se ter confirmado a atividade peroxidase do FDP, tentou-se quantificar essa atividade.

Para isso, realizaram-se um conjunto de ensaios nos quais se variou a concentração de peróxido de hidrogénio (0 – 10 mM) – Figura 59.

Deste modo, podemos determinar a atividade máxima do enzima, sendo que para uma concentração superior a 5mM apresenta uma atividade de cerca 0.06 s^{-1} .

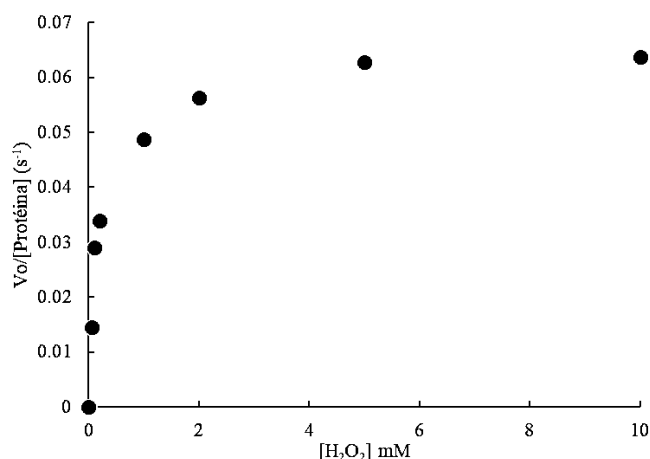


Figura 59– Atividade específica do FDP na redução do substrato peróxido de hidrogênio

A atividade observada é comparada a atividade obtida pelas rubreritrinas que são referidas na literatura como peroxidases, sendo que enquanto a FDP apresenta uma atividade máxima de 0.26 $\mu\text{molesH}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ as rubreritrinas tanto de *Clostridium acetobutylicum* como de *Entamoeba histolytica* demonstram uma atividade de 0,99 e 0.12 $\mu\text{molesH}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ respetivamente^[5].

3.7 Discussão geral

Neste trabalho teve-se como objetivos principais a caracterização das proteínas bem como a determinação da capacidade catalítica dos enzimas para diferentes substratos. Conseguiu-se expressar com sucesso as três proteínas alvo de *C. difficile* P28, rubredoxina (Rd), *High-Molecular weight-rubredoxin* (HMW-Rd) e proteínas flavodiférrica,

Em relação à caracterização das proteínas, observou-se que em relação ao enzima FDP, este encontra-se na sua forma tetramérica, apresentando um tamanho esperado por monómero de 45 kDa com uma flavina do tipo FMN tendo potenciais de redução de +70mV e +30mV. Como outras enzimas do mesmo tipo apresenta um espectro de RPE quando o centro binuclear de ferro se encontra no estado de valência mista, com $g=1.95, 1.91$ e 1.79 .

No caso do enzima HMW-Rd, encontra-se na forma dimérica, manifestando um tamanho esperado por monómero de cerca de 23kDa, com uma flavina também do tipo FMN e um centro tipo rubredoxina. Os potenciais de redução do FMN e do centro rubredoxina são, dentro do erro experimental, idênticos a 40 mV

No caso da proteína Rd apresentou um potencial de redução de +115 mV, e um espectro de EPR característico de proteínas deste tipo, contendo um sinal rômico com $g= 9.24, 4.72$ e 4.21 no estado oxidado.

Em relação à determinação da capacidade catalítica dos enzimas, nomeadamente do FDP, começou-se esta parte do trabalho a tentar construir um possível mecanismo de redução do FDP.

O mecanismo que obteve melhor resultado na redução do FDP, foi quando as três proteínas estavam presentes, tendo como dador inicial de elétrons NADH. Com o possível mecanismo de transferência eletrônica encontrado, efetuaram-se os ensaios para determinar a atividade específica do enzima para os substratos, obtendo -se uma atividade do enzima FDP de 0.038 s^{-1} para a redução do oxigênio, 0.114 s^{-1} para a redução do NO e de 0.06 s^{-1} para o peróxido de hidrogênio.

A atividade determinada do enzima FDP para os substratos O_2 e NO foi muito baixa comparativamente a enzimas do mesmo tipo, podendo indicar a existência de três problemas, um em que os parceiros de redução do FDP não são os apropriados, explicando o tempo que a reação demora para todas as proteínas estarem reduzidas, um segundo referente a eficiência na reconstituição do enzima FDP e um terceiro causado pela existência de outra FDP da classe A (WP_008819255.1) genoma de *C. difficile* P28 que podem apresentar uma afinidade maior para os substratos analisados. Por exemplo, o potencial de redução da rubredoxina é positivo, superior aos da FDP, sugerindo que não é o parceiro fisiológico para este enzima.

Parte IV

Conclusão

4 . Conclusão

Este trabalho contribuiu para o estabelecimento da função de enzimas microbianas no metabolismo de diversos substratos nomeadamente oxigénio, óxido nítrico e peróxido de hidrogénio

O microrganismo *C. difficile* é um patogénico humano responsável por infeções gastro intestinais, apresentando no seu genoma um conjunto de proteínas, entre as quais proteínas flavodiféricas, oxidoredutase, nitroredutases, rubreritinas entre outras, capazes de desintoxicar o organismo de espécies reativas tanto de oxigénio como de azoto.

Neste estudo foi estudado um possível mecanismo de destoxificação do organismo face a essas espécies envolvendo uma proteína flavodiférica, uma rubredoxina de alto peso molecular descrita como oxidoredutase e uma rubredoxina.

De acordo com os ensaios realizados foi possível verificar a transferência eletrónica entre as três proteínas, resultando no enzima FDP no estado reduzido, concluindo desse modo que o FDP depende dos seus parceiros fisiológicos, que neste caso consistiram no HMW-Rd e Rd de *C. difficile* para exercer as suas funções fisiológicas.

O enzima FDP apresentou atividade para 3 tipos diferentes de substrato (O_2 , NO e H_2O_2) porém a atividade demonstrada tanto para o oxigénio como para o NO foram muito abaixo das verificadas para enzimas do mesmo tipo^[47].

Sendo propostas três possíveis justificações para estes resultados, a primeira é a escala de tempo necessária para que a transferência eletrónica ocorra entre as proteínas, podendo não se estarem a ser utilizados os parceiros fisiológicos ideais para o enzima. A segunda justificação poderá estar relacionada com a incompleta reconstituição realizada no enzima FDP. Finalmente, a terceira possível justificação é a existência neste organismo de outra proteína flavodiférica da classe A, bem como outras oxidoredutase e nitroredutases, que podem apresentar uma atividade mais alta que a FDP utilizada neste trabalho.

A existência de outra FDP abriu a porta para uma possível continuação deste trabalho de modo a que as suas atividades possam ser comparadas e que possa tentar encontrar um melhor mecanismo para a destoxificação do organismo face a ROS e RNS.

Parte V

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- [1]- Zerkle, A. L., et al. (2017) Onset of the aerobic nitrogen cycle during the great oxidation event, NATURE 542, 465-467 **doi:10.1038/nature20826**
- [2] –Inupakutika, M. A, et al. (2016) The evolution of reactive oxygen species metabolism J Exp Bot 67:21, 5933-5943 **doi:10.1093/jxb/erw382**
- [3] –Romão, C. V., et al (2016) The dual function of flavodiiron proteins: oxygen and/or nitric, JBIC 21, 39-52 **doi:10.1007/s00775-015-1329-4**
- [4] -Liu, N., et al (2014) Antioxidant Enzymes Regulate Reactive Oxygen Species during Pod Elongation in Pisum sativum and Brassica chinesis, PLoS 9(2):e87588 **doi:10.1371/journal.pone.0087588**
- [5]- Carrilho, J. (2014) Enzimas microbianas com centros diférricos na resposta ao stress oxidativo, Universidade de Lisboa
- [6]-Evans P., Halliwell B. (1999) Free Radical and Hearing , ANNALS of the New York Academy of Sciences, 28:884,19-40 **doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08633.x**
- [7]- <https://bionews-tx.com/clostridium-difficile-need-know/> (10/7/2017)
- [8]- Vicente, J. B., et al (2009) Redox properties of the oxygen-detoxifying flavodiiron protein from the human parasite Giardia intestinalis, Elsevier 488, 9-13 **doi:10.1016/j.abb.2009.06.011**
- [9] -Bókkon, I. (2012) Recognition of Functional Roles of Free Radicals, Curr Neuropharmacol, 10:4, 287-288 **doi:10.2174/157015912804499474**
- [10]-Ghisla, S. and Edmondson, D. (2001) Flavin Coenzymes, Encyclopedia of life science, 1-9 **doi:10.1002/9780470015902.a0000654.pub2**
- [11]- Bruice T. C. (1984) Oxygen Flavin Chemistry, IJC, 24, 54-61 **doi:10.1002/ijch.198400008**
- [12]- Jomova, K., et al. (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders, Mol Cell Biochem 345, 91-104 **doi: 10.1007/s11010-010-0563-X**
- [13]- Verstraete, I. M., et al. (2017) The alternative sigma factor σ_b plays a crucial role in adaptive strategies of clostridium difficile during gut infection, sfam 19:5, 1933-1958 **doi:10.1111/1462-2920.13696**
- [14] -Abt M. C., et al (2016) Clostridium Difficile colitis: pathogenesis and host defence, Nat Rev Microbiol, 14:10, 609-620 **doi:10.1038/nrmicro.2016.108**
- [15]-Lee, J. Y., et al (2013) Effects of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species on HIF-1 α Stabilization Following *Clostridium Difficile* Toxin Exposure of the Caco-2 Epithelial Cell Line, Cell Physiol Biochem, 32:2, 417-430 **doi:10.1159/000354448**
- [16]- Adams, C. M., et al. (2013) Structural and Functional Analysis of the CspB Protease Required for *Clostridium* Spore Germination, PLoS Pathog 9(2): e1003165. **doi:10.1371/journal.ppat.1003165**
- [17]- <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AVMC01000000> (7/7/2017)

- [18]- Pinto, A. F., et al (2011) Desulforubrythrin from *Campylobacter jejuni* a novel multidomain protein, *JBIC* 16, 501-510 **doi:10.1007/s00775-010-0749-4**
- [19]- Liu, J., et al (2014) metalloproteins containing cytochrome, iron -sulfur or cooper redox center, *Chem Rev*, 114:8 , 4366-469 **doi: 10.1021/cr400479b**.
- [20]- Silaghi-Dumitrescu R., et al (2003) A flavodiiron Protein and High Molecular Weight Rubredoxin From *Moorella thermoacetica* with Nitric Oxide reductase Activity *Biochemistry* 42:10 -2806-2815 **doi:10.1021/bi027253k**
- [21]- Chen, C. J., et al (2006)Crystal structure of rubredoxin from *Desulfovibrio gigas* to ultra-high 0.68 Å resolution, *Biochem Biophys Res Commun*,349:1, 79-90 **doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.205**
- [22]- Gamiz-Hernandez, A. P., et al (2011) Rubredoxin Function: Redox Behavior from Electrostatics, *J Chem Theory Comput*,7:3, 742-752 **doi:10.1021/ct100476h**
- [23]- Vicente J. B., Teixeira M. (2005) Redox and spectroscopic properties of the *Escherichia coli* Nitric Oxide-detoxifying System involving flavorubredoxin and its NADH -oxidizing redox partner, *Journal of Biological Chemistry* 280:41 34599-34608 **doi:10.1074/jbc.M506349200**
- [24]- Miriani, M., et al (2014) Rubredoxin refolding on nanostructured hydrophobic surfaces: Evidence for a new type of biomimetic chaperones, *Proteins* 82:11, 3154-3162 **doi: 10.1002/prot.24675**.
- [25]- Fauque, G. D., et al (1987) Isolation and characterization of a rubredoxin and a flavodoxin from *Desulfotribrio desulfuricans* Berre-Eau, *Elsevier Science* 215:1, 63-67.
- [26]- Das, A., et al (2001) Five-Gene Cluster in *Clostridium thermoaceticum* consisting of two divergent Operons Encoding Rubredoxin Oidoreductase- Rubredoxin and Rubrerythrin -Type A Flavoprotein – High-Molecular Weight Rubredoxin, *Journal of bacteriology* 1560-1567 **doi:10.1128/JB.183.5.1560-1567.2001**
- [27]- Chakraborty, S., et al (2017) Two proteins with Diaphorase activity from *clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72:3, 877-879 **doi:10.1271/bbb.70646**
- [28]- Vicente, J.B., et al (2007) Flavodiiron proteins: nitric oxide and/or oxygen reductases, *Handbook of Metalloproteins* 1 -19 **doi: 10.1002/0470028637.met218**
- [29]- Vicente J. B., et al (2008) Biochemical, spectroscopic, and thermodynamic properties of flavodiiron proteins, *Methods in Enzymology*, 437:2, 21-45 **doi:10.1016/S0076-6879(07)37002-X**
- [30]- Allahverdiyeva, Y., et al (2015) Cyanobacterial oxygenic photosynthesis is protected by flavodiiron proteins, *Life* 5, 716-743 **doi:10.3390/life5010716**
- [31] – Gonçalves, V. L., et al (2014) Flavodiiron Oxygen Reductase from *Entamoeba histolytica*, *Journal of biological chemistry* 289:41 **doi:10.1074/jbc.M114.579086**
- [32] - https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/strains_vectors/vectors/pdf/pET-24map.pdf (7/7/2017)
- [33]- Simpson, R. J. (2014) Quantifying Protein by Bicinchoninic Acid, *Cold Spring Harb Protoc*. **doi: 10.1101/pdb.prot47232**

- [34]-
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc71501796_20161014020504.pdf (28/8/2017)
- [35]- Jancarik, J. e Kim S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *J.Appl.Cryst.*, 24, 409-411 **doi: 10.1107/S0021889891004430**
- [36] - Wooh, J.W. et al (2003) Comparison of three commercial sparse-matrix crystallization screens, *Act. Cryst.*, 59, 769-772 doi:10.1107/S0907444903002919
- [37] – Sieker, L. et al (1995) Zinc- and iron-rubredoxins from *Clostridium pasteurianum* at atomic resolution: A high-precision model of a ZnS4 coordination unit in a protein, *Biochemistry*, 93, 8836-8840
- [38] – Sieker, L. et al (1976) Some comparisons between two Crystallized Anaerobic Bacterial Rubredoxin from *Desulfovibrio gigas* and *D. vulgaris*, *JMB*, 107, 179-182
- [39] – Weber, P. (1990) A protein crystallization strategy using automated grid searches on successively finer grids, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* , 1:1, 31-37. **Doi: 10.1016/S1046-2023(05)80144-6**
- [40] – Zhang, J.(2012) Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells, *Protocol*, 7:6, 1068-1085 doi:**10.1038/nprot.2012.048**
- [41] – Kelley, L. et al (2015)The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nature Protocols*10, 845–858 doi: **10.1038/nprot.2015.053**
- [42]- Emsley, P., et al(2010)Features and development of *Coot*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 486–501. **doi: 10.1107/S0907444910007493**
- [43] – Chapman S. K. and Graeme A. R. (1999) Flavoproteins protocols, *Methods in Molecular Biology*, 131 **doi:10.1385/159259266X**
- [44] – Berkel, W. (2009) chemistry of flavoenzymes, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* 823-833 **doi: 10.1002/9780470048672.wecb168**
- [45] – Wastl, J. et al (2000) Eukaryotically Encoded and Chloroplast-located Rubredoxin Is Associated with Photosystem II, *JBC*, 275, 30058-30063 , **doi: 10.1074/jbc.M004629200**
- [46] - Rodrigues R., *et al* (2006) *Desulfovibrio gigas* Flavodiiron Protein Affords Protection against Nitrosative Stress In Vivo, *J Bacteriol.* 188:8, 2745-51, **doi: 10.1128/JB.188.8.2745-2751.2006**
- [47] – Vicente, JB., et al (2008)Kinetic Characterization of the *Escherichia coli* Nitric Oxide Reductase Flavorubredoxin, *Methods Enzymol*, 437, 47-62, **doi: 10.1016/S0076-6879(07)37003-1.**
- [48] -Rodrigues, J. et al. (2005) Rubredoxin acts as an electron donor for neelaredoxin in *Archaeoglobus fulgidus* , *BBRC*, 329, 1300–1305, **doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.114**
- [49] - Gillès de Pélichy, LD., Smith ET.,(1999) Redox Properties of Mesophilic and Hyperthermophilic Rubredoxins as a Function of Pressure and Temperature, *Biochemistry*, 38:24, 7874-80, **doi: 10.1021/bi990322j**

[50] Zheng, H. et al (2003)Redox properties of rubredoxin variants as a function of solvent composition and temperature: investigation of monopolar and dipolar interactions, JBIC, 8: 12–18 **doi:10.1007/s00775-002-0380-0**

[51]- LeGall, J. et al (1998) Characterisation of a new rubredoxin isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* 27774: definition of a new family of rubredoxins, FEBS, 429, 295-298 **doi: 10.1016/S0014-5793(98)00610-3**

[52] -Auchère F, et al (2004) Overexpression and purification of *Treponema pallidum* rubredoxin; kinetic evidence for a superoxide-mediated electron transfer with the superoxide reductase neelaredoxin, JBIC, 9:7, 839-49, **doi: 10.1007/s00775-004-0584-6**

[53] – Yoon, KS., et al.(1999) Rubredoxin from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* functions as an electron acceptor for pyruvate ferredoxin oxidoreductase, JBC, 274:42, 29772-8, **doi: 10.1074/jbc.274.42.29772**

Anexos

Tabela 1A -lista de proteínas que possivelmente estão associadas à destoxificação de ROS e RNS. A lista destas proteínas foi obtida através da análise do genoma completo de *peptoclostridium difficile* P28 (GCA_000450985.2), assinaladas a amarelo as proteínas utilizadas neste estudo.

<i>Proteína</i>	<i>Locus</i>	<i>Proteína</i>	<i>Locus</i>
Proteína da família das rubredoxinas	WP_021419802.1	Oxidoredutase dependente de NADP	WP_021420562.1
Rubredoxina	WP_008816574.1	Oxidoredutase dependente de NADP	WP_009588365.1
Proteína da família das Rubreritrina	WP_002606495.1	Proteína da família das Flavinas oxidoredutase	WP_008819105.1
Proteína da família das Rubreritrina	WP_002608358.1	Flavina oxidoredutase/NADH oxidase	WP_021420961.1
Piruvato: Ferridoxina oxidoredutase (flavodoxina)	WP_002608271.1	NADH:Quinona oxidoredutase	WP_008819456.1
FprA: Flavoproteína do tipo A	WP_008819165.1	Flavina reductase	WP_008728528.1
FprA: Flavoproteína do tipo A	WP_008819255.1	Nitroredutase	WP_008817083.1
Proteína da família das flavodoxinas	WP_002609990.1	Nitroredutase	WP_009269174.1
Proteína da família das flavodoxinas	WP_009587586.1	Nitroredutase	WP_008819375.1
Proteína da família das flavodoxinas	WP_008816294.1	Nitroredutase	WP_009589002.1
Proteína da família das flavodoxinas	WP_002607006.1	Proteína da família das nitroredutases	WP_021420499.1
Flavodoxina	WP_009270359.1	SRD da família das oxidoredutases	WP_002608004.1
Flavodoxina	WP_002610526.1	Oxidoredutase	WP_008816445.1
Flavodoxina	WP_009270020.1	Oxidoredutase	WP_008819261.1

Flavodoxina	WP_008816096.1	Dismutase do superóxido	WP_002607394.1
Flavina oxidoreductase/ NADH Oxidase	WP_021421120.1	Ferridoxina 4Fe-4S	WP_009587885.1
Flavina oxidoreductase/ NADH Oxidase	WP_021421121.1	Ferridoxina 4Fe-4S	WP_008818997.1
Oxidoreductase dependente de NADP	WP_009588420.1	Oxidoreductase dependente de NADP	WP_008816686.1
Oxidoreductase dependente de NADP	WP_009587576.1		